生命科学名著

〔美〕R.A.Weinberg 著
詹启敏 刘芝华 主译

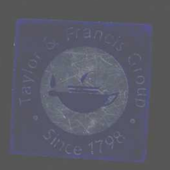


癌生物学

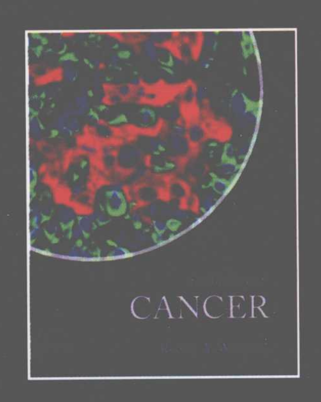
The Biology of Cancer







(Q-2206.0101)



"本书涵盖的广度是令人惊骇的……这本清晰明了的书带领读者稳步进入主题，没有一刻的厌倦……《癌生物学》无疑是当今该领域最权威的一本书。"

——*Science, 11 August 2006, Vol. 313. p5788*

"一本引人入胜的教科书……每个章节都像一个迷人的故事，从历史发展的角度，通过一些关键的实验阐述未来的挑战……在癌生物学领域目前尚无与之相媲美的教科书，也没有哪一本书如此前沿和富含信息。"

——*Nature*，*30 November 2006, Vol 444. p549*

"我完全陶醉在阅读这本癌生物学的书中，它很好地将肿瘤学研究中的激动人心、不确定性和希望传递给下一代的科学家、医生和受过高等教育的人们。"

——*DNA Repair, 9 December 2006,Vol 5. p1505-1506*



生物分社
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com



销售分类建议：生物医学/分子生物学

定价：145.00元(含光盘)

生命科学名著

The Biology of Cancer

癌生物学

〔美〕R. A. Weinberg 著
詹启敏 刘芝华 主译

科学出版社
北京

图字：01-2008-1322号

内 容 简 介

本书是一本适合生物学、医学专业本科生、研究生，以及相关领域研究人员参考的有关癌生物学研究的经典图书。

本书将近30年来癌生物学的最新研究成果系统而全面地进行了论述，采用通过介绍经典实验的方式使读者更深入了解和体会现代癌症生物学涉及的基本概念，不仅在结构和内容上更易使本科生或研究生接受，而且还提供了多种教学功能，对协助教师教学与学习也大有裨益。本书还包括许多对现代生物医学的研究探索，帮助读者来提高他们的分析能力，理解复杂的生物过程。灵活的版式设计及丰富的图片使本书更具吸引力。

本书彩图均附光盘。

图书在版编目(CIP)数据

癌生物学/（美）Weinberg，R. A. 著；詹启敏，刘芝华主译. —北京：科学出版社，2009
（生命科学名著）
书名原文：The Biology of Cancer
ISBN 978-7-03-023351-6

Ⅰ. 癌… Ⅱ. ①W…②詹…③刘… Ⅲ. 癌-生物学 Ⅳ. R73

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第172804号

责任编辑：王 静 李 悦 席 慧/责任校对：钟 洋
责任印制：钱玉芬/封面设计：陈 敬

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

源海印刷有限责任公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年4月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2009年4月第一次印刷 印张：51 1/4
印数：1—3 000 字数：1 203 000

定价：145.00元（含光盘）

（如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉）

《癌生物学》中译版编委会名单

（按章节排序）

黄常志　刘芝华　徐宁志　詹启敏　吕有勇　王明荣　赵晓航
张叔人　林　晨

翻译人员

（按汉语拼音排序）

董乔梅　杜小莉　郭瑞芳　郭素娟　郝佳洁　何　平　何　顺
贺　欢　黄常志　黄唯燕　贾立立　李　丹　林　晨　林德晨
刘　梅　刘曙光　刘芝华　吕有勇　罗　清　马　飞　马怡茗
潘元明　钱海利　任传利　施桂兰　史志周　宋咏梅　孙玉琳
唐翌姝　田妍妍　王根宇　王明荣　王小春　王跃锜　王早早
徐宁志　闫　霜　严　志　晏　杰　于　静　苑　怡　詹启敏
张叔人　张　薇　张　钰　赵晓航　钟佳伶　钟　永　邹丽辉
朱红霞

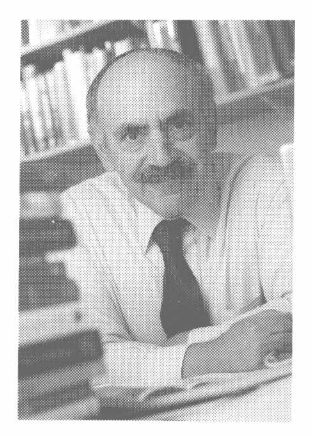
整　理

齐　文

参加翻译单位

中国医学科学院肿瘤研究所
北京大学临床肿瘤学院北京市肿瘤防治研究所

Weinberg 博士简介：



Robert A. Weinberg 博士是美国麻省理工学院的生物学教授，美国科学院院士，世界著名的 Whitehead 研究所创始人之一。他的研究方向为人类肿瘤的遗传学基础，其中最广为人知的是他的实验室发现了第一个人类癌基因 *Ras* 和第一个人类抑癌基因 *Rb*。他的一系列杰出研究工作已经成为肿瘤研究领域乃至整个医学生物学领域的重要里程碑。

Weinberg 于 1969 年获得麻省理工学院的博士学位，之后在 Weizmann 和 Salk 研究所工作。他作为最主要的领导者之一，于 1982 年创建了 Whitehead 研究所。几十年来，Weinberg 教授在 *Nature*、*Science*、*Cell* 等国际顶尖科学杂志上发表了一系列高水平的科研论文，他的研究工作和科学理论为肿瘤生物学领域开辟了新的研究方向。

Weinberg 教授由于在肿瘤学研究方面的造诣，获得过很多重大科技奖项，包括：1997 年的美国国家科学奖章（National Medal of Science），也称为总统科学奖章（Presidential Medal of Science）；1982 年被 *Discover* 杂志评选为年度科学家（Scientist of the Year）；1984 年由于肿瘤学研究方面的杰出成就获得 Bristol-Myers Award；1988 年获 General Motors Medal for Cancer Research；2004 年获得 Wolf 医学奖；2006 年获得 Landon-AACR 奖；2007 年获得 Otto Warburg 奖章。

他在肿瘤学研究方面的博学和成就为大家广为称道和享有盛名，同时大家还乐于称道的是他培养了一大批优秀的科学家。

序

本书的中文版翻译由詹启敏教授及其同事共同完成。

我们现在迎来了肿瘤学研究有史以来最好的时期。30 年前，我们对人类肿瘤发病的遗传及分子机理几乎一无所知，但在此之后，我们对这方面的认识增加了很多。实际上，我们现在已经或多或少地了解了一些人类肿瘤发生的共同之处。

事实上，肿瘤学研究不仅仅由好奇心驱使，那些对肿瘤学研究埋单的人（在很多国家是纳税人）期望着哪一天我们能够搞清楚肿瘤发生的根本原因，开发一些新的非常有效的治疗方法。然而到目前为止，这种潜力只被发掘了一小部分。相对于我们掌握的大量的关于发病机理的信息，由研究产生的新的有效的治疗方法还相对较少，由此也证明了肿瘤发病的复杂性，我们尚需做大量工作。

中国在未来肿瘤学研究的发展中将起到重要作用。当 30 年前对肿瘤的基础研究刚起步时，中国的生物医学研究还很匮乏，而现在，中国在经济发展和科学研究上正成为世界的领袖。来自中国的研究论文与日俱增，不断发表在世界顶级的学术期刊上，而这仅是一个小小的开端，在接下来的几十年中，中国的实验室将会涌现出大量的前沿科学研究成果。

未来的研究必将被中国经济的发展所推动，但最终，科学发展的决定性因素还是年轻的科研工作者的想象力和活力，这将决定科学的发展，没有他们，全世界所有的金钱也不可能推动科学的发展。

这种观念是我最初写这本书的主要动机。希望本书能够吸引大量年轻的科研工作者投身到肿瘤学研究的队伍中来，探索肿瘤发生发展的机理，开发新的诊断和治疗手段。这本书罗列了过去 30 年间肿瘤学研究领域的概况，年轻的科研工作者可以以此为基础，开展那些激动人心且极具挑战性的肿瘤学研究。如果确实能够做到这一点，那这本书无疑将是成功的。

也许有人会认为中国年轻的肿瘤学研究者应该集中精力研究那些在中国人群而不是西方人群中更具有危害性的疾病，如肝癌和胃癌。但是，作为一个日益凸显的世界性领袖，这样狭隘的研究领域不能真正体现中国新一代研究者的潜能，他们也应该变成肿瘤学研究的世界领袖，他们的视野应该扩展到全人类，而不仅仅局限于自己的同胞。

本书的章节是按照特定的次序排列的，以肿瘤学研究的开始作为开篇，随后的章节则按照历史的进程以及逻辑顺序进行安排。通读全书之后，你会真正了解现代肿瘤学研究的原理，而且整装待发，准备进入肿瘤学的很多亚专科领域。

尽情享受这个旅程吧！

R. A. Weinberg

2008 年 6 月 19 日

于马萨诸塞州剑桥城

Foreword by the Author

This translation was organized by Dr. Qimin Zhan and carried out by a number of his colleagues.

It comes at a highly auspicious time in the history of cancer research. Three decades ago, we knew almost nothing about the genetic and molecular mechanisms underlying human tumor pathogenesis; in the intervening time we have learned much. Indeed, we now understand in outline and, in many cases in great detail, how many common human cancers arise.

In truth, this research was not undertaken solely out of intellectual curiosity. Instead, those who paid for much of this research—the taxpayers in many countries—did so with the anticipation that if we would one day understand the causal forces mechanisms of tumor development, we would be well positioned to develop novel, highly effective treatments. This potential has, until now, only been realized in small part. Relative to the wealth of information known about the pathogenesis, the effective novel treatments that have been informed by this research are relatively few, a testimonial to the complexity of cancer pathogenesis and the fact that we still need to learn much more.

China will increasingly play a major role in these future developments. When this basic cancer research began three decades ago, its biomedical research was backward and rudimentary. Now, China is poised to become a world leader, both economically and scientifically. Increasingly, research papers from China are appearing in the leading scientific journals worldwide, and this represents only the small beginnings to a flood of cutting-edge research that will emanate from Chinese labs over the next decades.

This future research will surely be enabled by the burgeoning Chinese economy. But in the end, the rate-limiting determinants of scientific progress will be the young researchers whose imaginations and energies are required to drive research forward. Without them, all the money in the world cannot push progress forward.

This notion leads, in turn, to the main motive for writing this textbook, its use as a recruiting pamphlet to attract large numbers of young researchers into the field of cancer research, including discovering its underlying mechanisms and developing new diagnostic and therapeutic modalities. This book lays out the logical outlines of this field of science as they have been assembled over the past three decades. It represents a foundation from which young researchers can advance into the exciting and often challenging field of contemporary cancer research. This book will be judged a success if it does indeed succeed in such recruitment.

Some might argue that these young Chinese cancer researchers should focus on studying the diseases that afflict the Chinese population more than those living in the West, such as liver and stomach cancer. Given its emergence as a world power, however, such a narrow focus would not realize the true potential of the new generation of Chinese research: they too should become world leaders of cancer research whose vision extends to all aspects of the disease, not just those aspects that afflict their countrymen.

The chapters in this book are laid out in a particular order, with the beginnings of this research in the early chapters and the historical progression of this field presented in logical order in the chapters that follow. Those who finish reading this book will indeed be well grounded in the principles of modern cancer research and well equipped to enter into its multiple sub-specialties. Enjoy the ride!

R. A. Weinberg
Cambridge Massachusetts
June 19, 2008

译者的话

由美国麻省理工大学 Whitehead 研究所 Robert A. Weinberg 教授所著的《癌生物学》一书是当今肿瘤生物学领域最具权威性的一本专著。该书的章节深入浅出，从癌症的本质、癌症的病因起源、癌症发生发展的分子机理、癌症的侵袭转移到癌症的免疫治疗及个体化治疗等各个方面，从历史发展的角度，对肿瘤进行了全方位的描述，并对未来肿瘤研究的发展及挑战进行了探讨。

肿瘤作为严重危害人类生命健康的重大疾病已引起人们的广泛关注，世界各国都投入了巨大的人力物力对此进行研究，并取得了突飞猛进的进展，研究成果日新月异，其发展速度之快，信息量之大，令人目不暇接。但肿瘤是一个非常复杂的疾病，迄今为止人们对此尚缺乏全面而透彻的认识，因此肿瘤学研究目前仍处于一个探索阶段，很多领域需要我们去开拓，不断完善和发展。近几年来，我们欣喜地看到越来越多的青年科研人员加入到肿瘤学研究的队伍中来，他们迫切需要一本能够系统地反映肿瘤学研究进展的优秀参考读物。为满足广大科研人员尤其是年轻学生对肿瘤学研究领域前沿知识的渴求，我们翻译了这本目前享誉全球的肿瘤生物学著作。

《癌生物学》这本书内容博大精深，从科学前沿的视野对肿瘤学研究的历史、现状及未来进行了详细的描述，是针对从事肿瘤学研究的科研人员、教师和学生的一本优秀教材，是一本难得的富有启迪性的好书。本书的翻译工作由中国医学科学院肿瘤研究所和北京市肿瘤防治研究所的一批工作在肿瘤学研究领域一线的科研人员共同承担完成，每章的译者都是从事和熟悉该方面内容的专家，同时又是活跃在肿瘤学教学领域的主力军，他们对本书内容的背景材料和最新进展都有比较深入的了解。全书翻译力求忠实于原著，准确无误、通俗易懂。

我们希望本书的出版将有助于我国肿瘤学研究领域教学和科研水平的提高，吸引更多的年轻学子加入到肿瘤学研究的队伍中来，培养我们的肿瘤学研究专业人才，为我国的肿瘤学发展做出贡献。谨以此书的译稿奉献给我国医学界、教育界和科技界的广大读者。

詹启敏　刘芝华

中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室

2008 年 10 月于北京

目　　录

第 1 章　细胞和有机体的生物学与遗传学特性

简单或者有核的原生质体是所有生命的基础。因此所有的生命体都是同源的，所有的生命形式在根本上都具有同一特性。化学家的发现也揭示出生命物质的组成具有惊人的相似性。

Thomas Henry Huxley，进化生物学家，1868 年

在大肠杆菌中的正确发现一定也同样适用于大象。

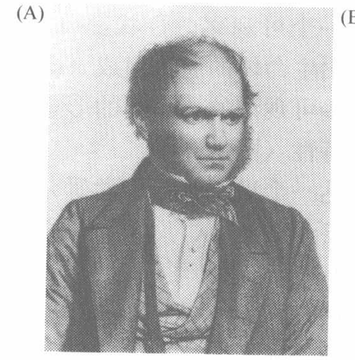
Jacques Monod，分子生物学先驱，1954 年

20 世纪生物学的革命对生物学研究的各个领域都有深远影响，癌症研究也是其中之一。这次革命的成果不仅揭示出遗传特征与遗传学的大致轮廓与细节内容，还解释了细胞如何生长与分裂，如何聚集并形成组织，以及组织如何在特定基因的调控下发育。本书后面的内容将直接或间接的对这一门新学科进行描述。

这次革命开始于 20 世纪中叶，由 Watson 和 Crick 发现 DNA 双螺旋结构引发并且一直延续至今。然而，那次突破性发现至今的时间确实太短，以至于我们还无法完全理解其重要意义和长远影响。在那次发现后逐步发展起来的分子生物学解决了 20 世纪很多重要的生物学问题——细胞和组织的遗传组成如何决定其形态与功能。

如果没有这些分子生物学的基础，现代癌症研究会像其他许多生物学科一样成为一门描述性的科学，只能对各种生物现象进行分类，而无法解释其发生机制。现在，生物

(A)



(B)



图 1.1　达尔文和孟德尔　(A)达尔文于 1859 年出版的《物种起源》借由自然选择在生命起源、肌体复杂性的进化以及物种亲缘关系等方面引发了深刻的思考。(B) 达尔文的进化论在孟德尔的成果出现之前一直缺乏理论基础。达尔文的进化论与孟德尔的遗传学的结合是大部分现代生物学思想的基础。（A，from the Grace K. Babson Collection of the Works of Sir Isaac Newton on Permanent deposit at the Dibner Institute and Burndy Library，Cambridge，MA；B，courtesy of the Mendelianum Museum Moraviae，Brno，Czech Republic.）

学的各个分支学科的发现不断丰富着我们对于癌症发生的了解，而这些发现大多依赖于分子生物学和遗传学理论。出乎意料的是，我们对癌症的许多深入了解并不是从癌症研究者的实验室得来的。相反，对酵母菌、蠕虫和果蝇等多种生物体的研究为我们提供了大量知识资源，推动癌症研究迅速向前发展。

那些站在19世纪巨人的肩膀上引领这次科学革命的人们，尤其是达尔文和孟德尔（图1.1）。这两位先驱建立起了影响现代生物学思想各个方面的概念，如果没有这些概念，分子生物学和当代癌症研究都将是不可想象的。因此，在本章中我们将经常提及达尔文提出的进化过程和孟德尔构建的遗传学体系。

1.1 孟德尔建立了遗传学基本定律

早在19世纪，人们就发现了基因如何从一个复杂的生物体传递下去的遗传定律，这一定律至今仍然基本没有改变。根据19世纪60年代的研究成果，孟德尔提出了这些规律，并且对它们如何影响独立生物体的形态和行为进行了描述。他的研究主要是集中于豌豆的遗传学。然而，他的研究结果和结论很快就被遗忘了，直到1900年才被三个相互独立的研究者再次发现。在其后的十年中，人们发现那些被称之为孟德尔遗传学的定律适用于所有的有性生物体，包括**多细胞动物**以及**多细胞植物**。

孟德尔最基本的见解都源自于他意识到遗传信息是以微粒的形式从一个生物体传递给其后代的。这也就意味着，生命体所携带的所有遗传信息，也就是我们现在称之为“基因组”的东西，是由后来被命名为基因的一个个相互分离、相互独立的信息单位组成的。直到最近几年，我们才开始精确了解哺乳动物的基因组中包含多少个不同的基因。近期对人类基因组的分析已将基因数量确定为22 000个左右，仅仅稍高于黄果蝇基因组中确定的19 000个基因。

孟德尔的研究同时暗示，生物体的物理和化学组成能够被划分为一系列独立可分离的实体（当然，这种可分离性暗藏在我们描述解剖结构与功能的语言中，我们用不同的词汇来描述鼻子、胳膊和胃）。他更进一步指出不同的解剖部分是由不同的基因控制的。他发现控制豌豆是否平滑的遗传物质与控制植株高矮和花朵颜色的遗传物质是相互独立的。实际上，这些个体中每一个可观察的性状都可以追溯到一个独立的基因作为其蓝图。因此，孟德尔的研究表明生命体的遗传组成（即它的**基因型**）可以划分为数百甚至数千个独立的信息单位；那些可观测的、表面的形态（即**表型**）相应地也可以被细分为大量相互独立的物理或化学特性（图1.2）。

孟德尔的理论启动了长达一个世纪的遗传学研究计划，这些遗传学家应用孟德尔原理来研究各种实验动物数以千计的性状，包括果蝇（黑腹果蝇）、蠕虫（秀丽隐杆线虫）、鼠（家鼠）。在20世纪中叶，遗传学家也开始应用孟德尔原理去研究单细胞生物的遗传行为，如细菌大肠杆菌、面包酵母和酿酒酵母。基因型决定表型的原则也同样适用于更为简单的生物体及其遗传体系。

虽然孟德尔遗传学代表了当代遗传学的基础，但是，自从1865～1900年提出孟德尔遗传学后，它也经历了不断的调整和扩展。例如，很多单细胞生物都通过无性方式进行繁殖，也就是说不需要交配，这就使孟德尔的最初理论有进一步调整的需要。此外，

	种子形状	种子颜色	花朵颜色	花朵位置	豆荚形状	豆荚颜色	植株高度
第一性状（显性）	圆形	黄色	紫红色	中部	饱满	绿色	高
第二性状（隐性）	褶皱	绿色	白色	末端	瘦瘪	黄色	矮

图 1.2　遗传信息由独立的小体组成　孟德尔的一项基本见解：生命体的遗传物质是由独立的信息小体组成的，而每一个信息小体都对应于该生命体的一项可观测的性状。图中所示的是孟德尔育种实验中所研究的豌豆植株的 7 种性状。其中每一种性状都存在两种不同的表型，由被称为等位基因的不同形式的基因控制。当两个互交等位基因同时存在于一株植物时，其中一种性状（称为“显性的”）通常可以被观察到，而另外一种（称为“隐性的”）则不会。(Courtesy of J. Postlethwait.)

他认为生命体中的每一个特征都可以追溯到某一基因发出的指令，该观念随后也被认为是过于简单化了。生命体绝大多数可观测的性状都能够追溯至多个基因的共同作用。几乎所有存在于复杂生命体基因组中的基因都在复杂生命体、组织和生理过程的发育与维护中发挥多元的作用。

孟德尔遗传学第一次揭示出遗传信息在复杂植物和动物的基因组中是冗余存在的。孟德尔推测决定花的颜色和豆的形状的基因各有两个拷贝。而现在我们了解到这种 2 倍冗余存在于除性染色体外的整个基因组中。因此，更高等生命体的基因组又被称为**二倍体**。

孟德尔的观察结果同时也表明，一个基因的两份拷贝可能携带不同，甚至相互矛盾的信息。因此，一个基因拷贝可能是指定表面粗糙的豌豆，另一个则指定表面光滑的豌豆。在 20 世纪，同一基因的不同版本又被称为**等位基因**。如果生命体携有两个相同的等位基因，那么该生命体被称为是**纯合子**的。相反，如果其携有的是两个不同的等位基因，该生命体则被称为是**杂合子的**。

由于同一基因的两个等位基因可能携相反的指令，我们关于基因型如何决定表型的观点也变得更为复杂。孟德尔发现在决定某一性状的最终表现形式时，其中一个等位基因通常起主导作用。比如说，在豌豆基因组中决定豌豆形状的基因可能为杂合子，该基因携有一个光滑和一个粗糙的等位基因。但是，携有这样等位基因的豌豆总是产出具有

光滑表面的豌豆。这表明光滑的等位基因是**显性的**，而它总是能够在决定表型时压倒其**隐性**等位基因（粗糙）（图 1.2）。（如果使用遗传学用语来表述，我们应当说由某一基因编码的表型相对于另一个来讲是显性的，而后者则是隐性的。）

20 世纪的遗传学研究揭示了另外一个微妙的现象，同一基因的等位基因之间也存在相互作用。通常来说，两个相互矛盾的等位基因在决定结果时所起的作用是相互调和的，它们在彼此不同的信息中寻找着一种折中的方法。例如，如果决定金鱼草花朵颜色的基因具有并存的红色和白色的等位基因，那么该植株将会表现为粉色的花朵（图 1.3）。这就是一个**不完全显性**的代表性例子。在其他一些情况下，两个等位基因的作用能够同时表现出来，也就是**共显性**的现象。例如，当决定个体血型的基因位点为杂合子（如 A 和 B 等位基因）时，其红细胞将同时表达 A 和 B 两种抗体。

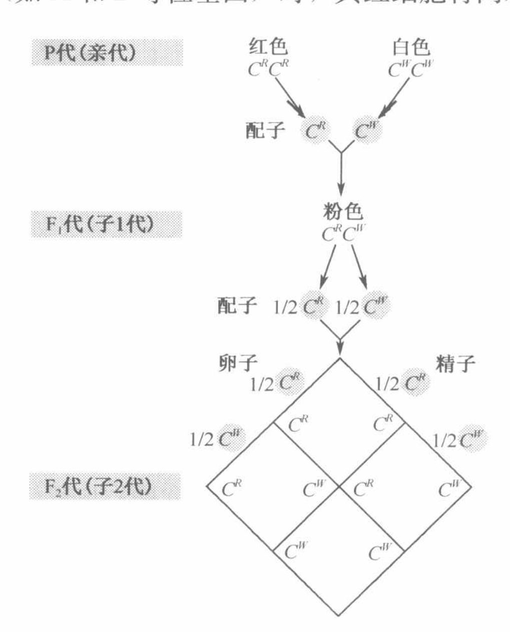


图 1.3　不完全显性等位基因　虽然孟德尔研究的一系列基因都只携有显性和隐性的等位基因，但是很多基因都通过更为复杂的方式来行使其职责，两个等位基因共同决定表现型的现象就称为不完全显性现象。正如这里所描述的，当开红花的金鱼草与开白花金鱼草授粉时，F_1 代中的后代都开出粉色的花朵。这些粉色金鱼草在遗传学上是杂合子，当它们与别的金鱼草授粉时，纯合子将在第二代中再次出现，开出红色或者白色的花朵。（Adapted from N. Campbell，Biology，4th ed. San Francisco，CA：Benjamin Cummings，1996.）

1.2　孟德尔遗传定律有助于解释达尔文进化论

在 20 世纪早期，人们并不清楚同一基因的不同等位基因是如何产生的。最初人们认为，信息内容的可变性似乎从进化开始时就已经存在于物种共同的基因文库中。这一观点不久后便发生了改变，在 20 世纪二三十年代，人们开始认识到遗传信息是易变的，遗传文本中的遗传信息如同其他文本中的一样，是可以被改变的。**突变**被认为是基因中信息内容改变的“肇事者”，它可以把一种等位基因转变为另外一种，或是从之前普遍存在于某一物种中的等位基因创造出新的等位基因。一个在某一物种大多数个体中都存在的等位基因通常被称为**野生型**，这种命名方式表示该等位基因天然地存在于众多健康组织中，并且与正常的结构与功能相符。

在一个物种进化的生存期内，突变不断地改变着它的基因组，该过程通常会持续几百万年。它能够随机改变基因组及其组成基因，为物种不断修改完善其基因组提供方法，即通过尝试新的基因型以获得新颖、改良的表型。基因组持续突变的结果是使一个

物种成员的遗传多样性在其进化历史中不断累积增加。因此，一个物种所有成员的基因组（即此物种的**基因库**）中的等位基因将随着该物种逐渐古老而变得更加异质。

这也意味着，与较为年轻的物种相比，较为古老的物种的基因组中携带有更多不同的等位基因。与比我们历史长 2 倍的黑猩猩相比，人类作为一个相对年轻的物种（历史不足 150 000 年）所拥有的等位基因和遗传多样性仅为其一半。

一个物种基因组中的等位基因在数百万年中持续的多样化，在一定程度上与达尔文最初提出的自然选择力有关。一个基因的某些等位基因与其他的相比可能会产生更为有利的表型，因此携有这些有利等位基因的个体，与那些属于同一物种但不含有利等位基因的成员相比，能够繁育更多的后代。因此，自然选择使得很多通过随机突变获得的等位基因被不断地清除。最终，不利的等位基因将从等位基因库中消失，有利的等位基因在数量上有所增加，而这个物种的整体适应能力也因此得到不断的提高。

现在，在距离孟德尔的理论被再次发现和孟德尔遗传学复兴一个世纪之后，我们逐步认识到在我们自己和所有哺乳动物的基因组中所蕴藏的大部分遗传信息似乎并不指定表型并且不与特定基因相联系。鉴于在 1944 年发现遗传信息是由 DNA 分子编码的，基因组中这些非编码的部分通常被称为垃圾基因（图 1.4）。只有大概 1.5%的哺乳动物基因组 DNA 携带编码蛋白结构的序列信息。近期对人、老鼠和狗基因组的序列对比结果显示，另外 2%的基因组参与编码重要信息以调节基因表达和调解其他未知功能。

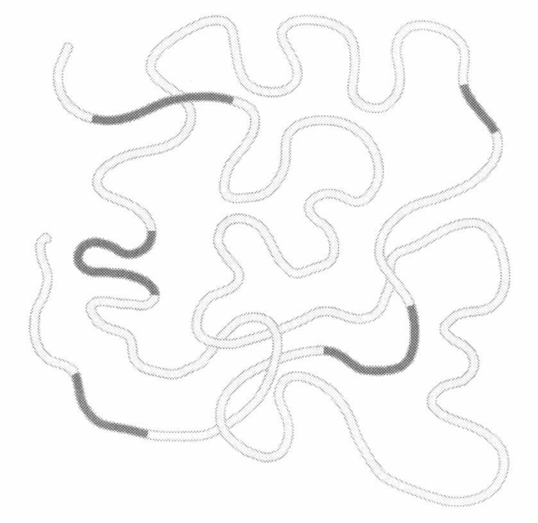


图 1.4 人类基因组中重要的生物学序列 人类基因组可以被视为漂浮在“垃圾”DNA 海洋上（黄色部分）的重要生物学序列（大约占所有基因组的 3.5%，红色部分）的集合。为了便于说明，对携带生物学信息的序列的比例进行了夸大。

突变随机发生于基因组中，它不加选择地改变有作用的基因和垃圾 DNA，因此绝大多数突变改变的是对细胞和组织的表型没有影响的遗传信息。这些对表型并不产生影响的突变，从自然选择的观点上来看属于**中性突变**（图 1.5）。正是由于这些突变创造出来的等位基因是无效的，它们的存在不会被依赖于观测表型的早期遗传学者发现。但是，随着 DNA 测序技术的出现，人们发现人类等生命体的基因组中存在数十万计，甚至数百万计的功能上的无效突变。其中，每个人的基因组都携带属于自身的一系列功能上无效的遗传学改变。多态性通常指将同一个物种中的正常个体彼此区分的外形和形式上的差异。现在，遗传学家运用**遗传多态性**这个概念来描述个体间、功能上相同的 DNA 序列的区别，这些区别表明每一个人的基因组都是独一无二的（图 1.6）。

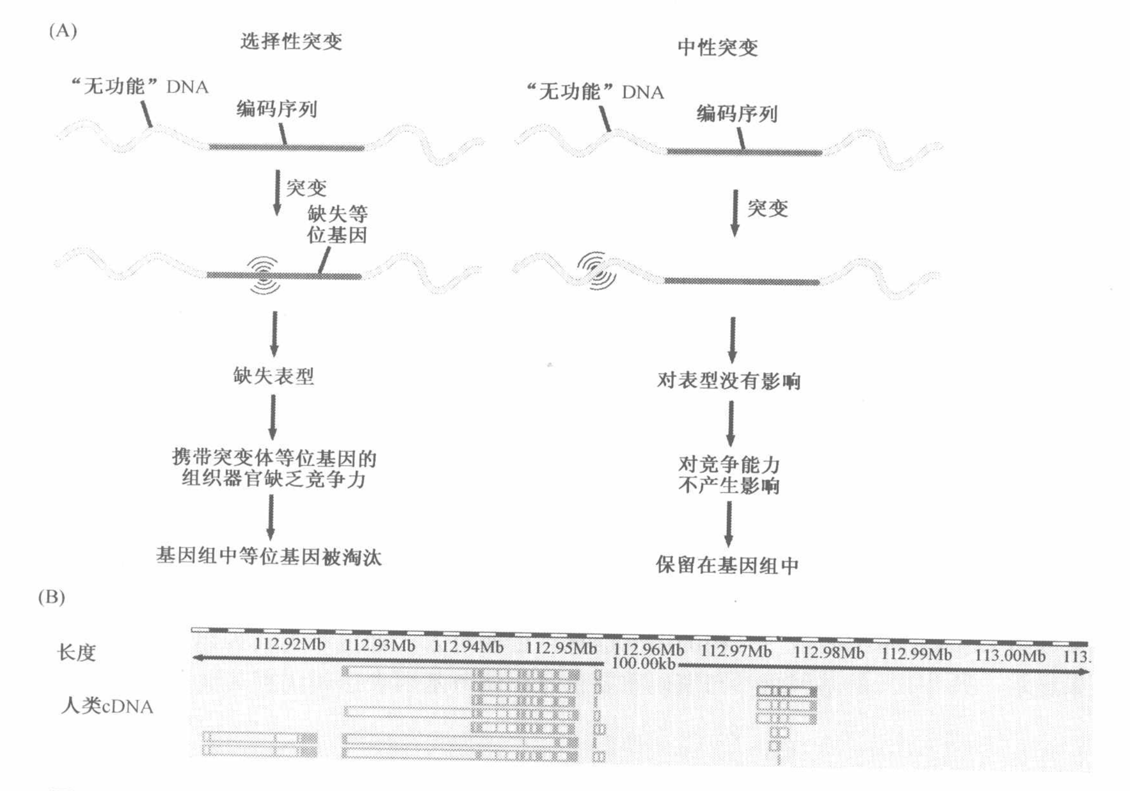


图 1.5 中性突变与进化 (A) 大多数基因的编码序列（红色）早已在漫长的进化时间中得到完善。因此，很多影响氨基酸序列以及蛋白质结构（左）的突变所建立起的一些等位基因，会为了生存而使生命体丧失某些功能。由于这个原因，这些突变体等位基因很可能从物种的基因库中消失。与此相反，在“垃圾”基因中发生的突变不会对表型产生影响，因此能够保留在该物种的基因库中。这就解释了为何编码的 DNA 序列在这漫长进化过程中的改变是缓慢的，而非编码的 DNA 序列却迅速地发生着变化。(B) 图中所示为在数以兆计的碱基对中随机选择的一个小片段的物理图谱，该片段位于人类 1 号染色体第 112 912 286 碱基对和 113 012 385 碱基对之间。在这个区域共发现 4 个不同的基因。每一个都被分裂为少量的岛屿（小的实心矩形），这些岛屿已知或者可能用于指定 mRNA 分子片段（外显子）和间隔序列间不编码的长连接（内含子）（图 1.7）。显然，基因间的大段 DNA 序列不与任何特定的生物功能相联系。(B. courtesy of The Wellcome Trust Sanger Institute.)

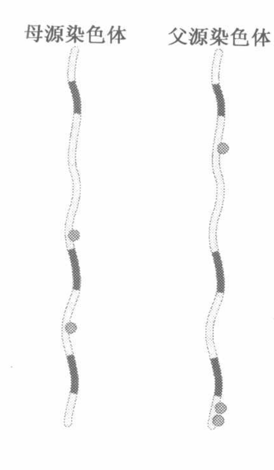


图 1.6 人类基因库中的多态性差异 因为大部分人类基因组 DNA 并不编码重要的生物学信息（黄色部分），它们的进化相对迅速，而其序列也已经积累了许多微妙的表型上无效的差别——多态性（图 1.5）。这种多态性能够像孟德尔等位基因一样进行传递，但它们在基因组中的存在则只能通过 DNA 测序等分子生物学技术来确定。圆点（绿色）表明存在于该染色体位点的序列与其在人类基因库中正常形式不同。举例来说，在一段染色体 DNA 正常的序列可能是 TAACTGG，而其变化形式 TTACTGG 则仅有少数人携带，这就构成了一种多态性。当多态性只存在于一条染色体而不存在于另外一条时，即使其附近的基因（红）以纯合子的构型存在，该区域仍然是杂合性的。

基因组中大约 3.5 %的基因被确定编码具有生物学功能的蛋白，这部分基因在进化过程中的行为与无功能 DNA 显著不同。无功能 DNA 序列发生的突变对生命体的生存不会产生影响。因此，发生于物种基因组非编码序列的突变能够在其基因库中幸存下来，并且在其进化历史中逐渐累积。相反，影响具有生物学功能的编码序列的突变通常会导致其功能的丧失，并且由此导致生命体丧失生存能力；因此，这些突变能够通过自然选择之力从基因库中淘汰，这就解释了为什么在漫长的进化过程中，确定生物学表型的遗传序列仅缓慢的变化（信息栏 1.1）。

信息栏 1.1　进化动力显示某些基因是高度保守的　许多基因所编码的细胞性状对细胞生存是必不可少的。这类基因对突变非常敏感。突变能够通过改变现有基因而不断产生新的基因序列，

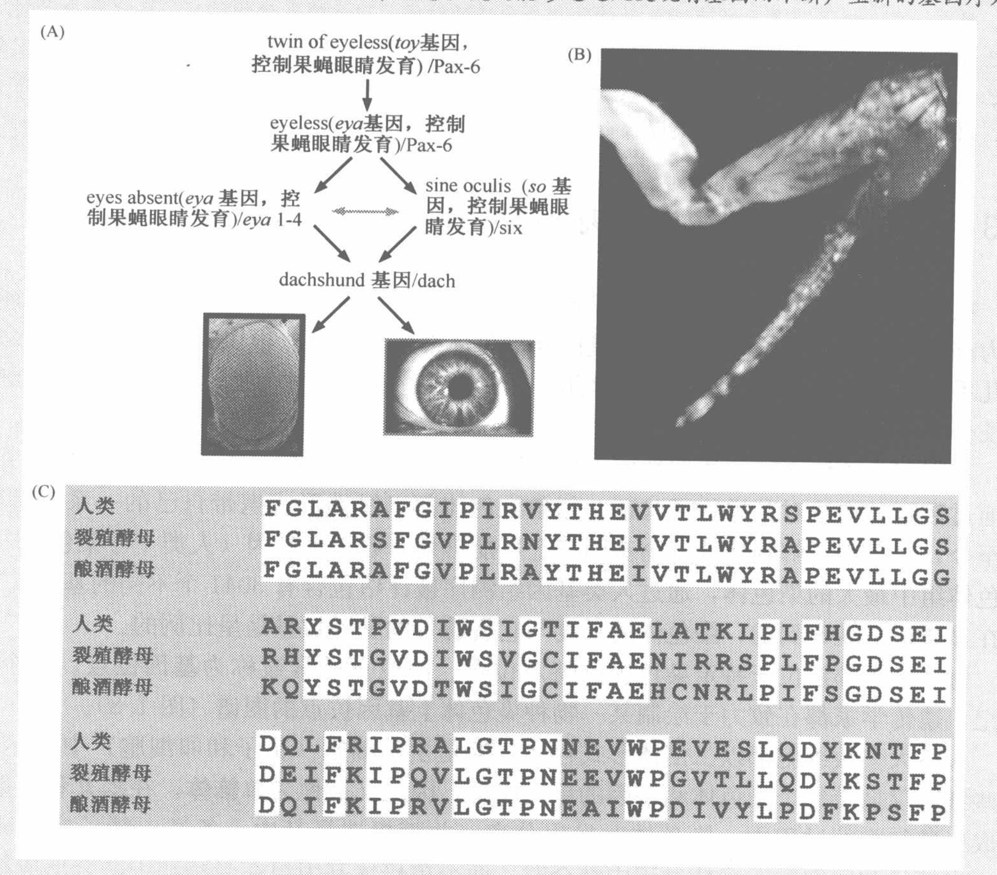


图 1.7　基因功能的高度保守性　两翼昆虫与哺乳动物最近的共同祖先生存于 6 亿多年前，两者的眼睛具有完全不同的组织结构。但是，控制两者眼睛发育的基因（无眼的两翼昆虫，Pax-6/小眼睛的小鼠）是可以互换的。（A）在信号转导系统中，调控眼睛发育的组件（黑色为两翼昆虫的，粉色为小鼠的）是高度保守和可以互换的。（B）当小鼠 Pax-6/小眼睛基因和果蝇的无眼基因在两翼昆虫胚胎不恰当的位置（异位）表达时，将导致两翼昆虫在其腿部发育出眼睛，这也证明两种基因是可以互换的。（C）同源蛋白质的氨基酸序列显示出基因功能在漫长进化过程中的保守性。这里，我们同时给出人类蛋白质的氨基酸序列和两种分别从裂殖酵母和酿酒酵母中获得的相应蛋白质的序列。（A，courtesy of I. Rebay；B，courtesy of Walter Gehring；C，from B. Alberts et al.，Essential Cell Biology，2nd ed. New York：Garland Science，2004.）

自然选择则对这些序列进行检测，并且决定它们所指定的表型是否比先前存在的形式更加有益。几乎不变的是，细胞和生命体生存所必要的基因序列在数百万年前就已经得到了完善。因此，在这些基因中发生的改变几乎都是有害的，甚至将会损失细胞以至生命体的生存力。这些突变的等位基因很快就会丢失，因为携带它们的突变体将无法留下后代。这就解释了为什么在进化过程中很多基因序列是高度保守的。更精确地说是它们所编码的蛋白质的结构是高度保守的。

事实上，我们自身细胞中存在和必需的绝大多数蛋白质最初都是在单细胞真核生物进化时产生的。无数的观察结果显示，多数人类蛋白质都能够在单细胞**真核生物**中找到类似物，如面包酵母。另外一些高度保守的基因和蛋白质则起源于第一个多细胞动物的出现；这些基因使不同的器官得以发育，有机体的生理学得以发展。因此，另外一部分人类基因和蛋白质在蠕虫和两翼昆虫中也存在复本的形式（图 1.7）。

早在一亿五千多万年前所有哺乳动物的祖先出现的时候，现代哺乳动物所有的生化和分子特征就已经存在了。这些特征在漫长的进化时间里只发生了少量改变，表明在各种哺乳动物出现前它们就已经达到最优化。这也同时解释了为什么所有哺乳动物的胚胎发生、生理和生物化学都非常相似，以致通过研究 laboratory 小鼠得出的结论对人类也同样适用。

1.3 孟德尔遗传定律决定基因和染色体如何运转

在 20 世纪的最初 10 年，人们发现孟德尔遗传定律与光学显微镜下可见的染色体的行为有惊人的相似之处。孟德尔的基因和染色体都成对存在。很快人们发现复杂生命体中几乎所有细胞都拥有相同的染色体组，而这一染色体组，常被称为**核型**，在每个细胞生长分化周期中都被复制一次。

基因与染色体之间的相似性使人们推测称为基因的信息包是由染色体携带的，并随后通过数百种方法对其进行了验证。每条染色体都以线性形式携带自己的一系列基因。时至今日，我们了解到哺乳动物基因组上可能排列有数千个基因（人类 1 号染色体——染色体组中最大的染色体，通过人类基因组测序被评估包含有 3041 个不同的基因）。如同在显微镜下观察到的，染色体的长度与它所携带的基因数量是呈比例的。

每个基因都定位于特定染色体的特定位点。该位点通常被称为**基因位点**。整个 20 世纪，遗传学家都在致力于绘制某一物种染色体上基因位点的图谱（图 1.8）。

人体大多数细胞都以二倍体形式存在，但是生殖细胞（精子和卵细胞）中却不然。这些细胞仅携带每个染色体和基因的单个拷贝，因此又被称为**单倍体**。在睾丸和卵巢中形成生殖细胞的过程中，染色体对发生分离，并随机选择其中一条进入精子或者卵细胞。当精子和卵细胞在受精过程中结合时，两个单倍体基因组在受精卵中融合形成新的二倍体基因组。生命体中所有细胞都直接遗传来自这个二倍体细胞，并且继承了其二倍体基因组的精确拷贝。在人类等大型多细胞生命体中，这意味着该基因组的完整拷贝存在于身体的几乎全部 3×10^{13} 个细胞中。

随着人们认识到基因存在于染色体中，以及人体中几乎所有的细胞都拥有一套完整的染色体组，一个新的结论应运而生：基因通过影响单个细胞的行为来创建整个生命体的表型。而另外一种观点：生命体中某些独特的结构位点所存在的一系列基因能够控制整个生命体的发育和生理学，现在看来并不可信。

性染色体违背了染色体成对出现的规则。在雌性有胎盘动物（胚胎发育的大多数过

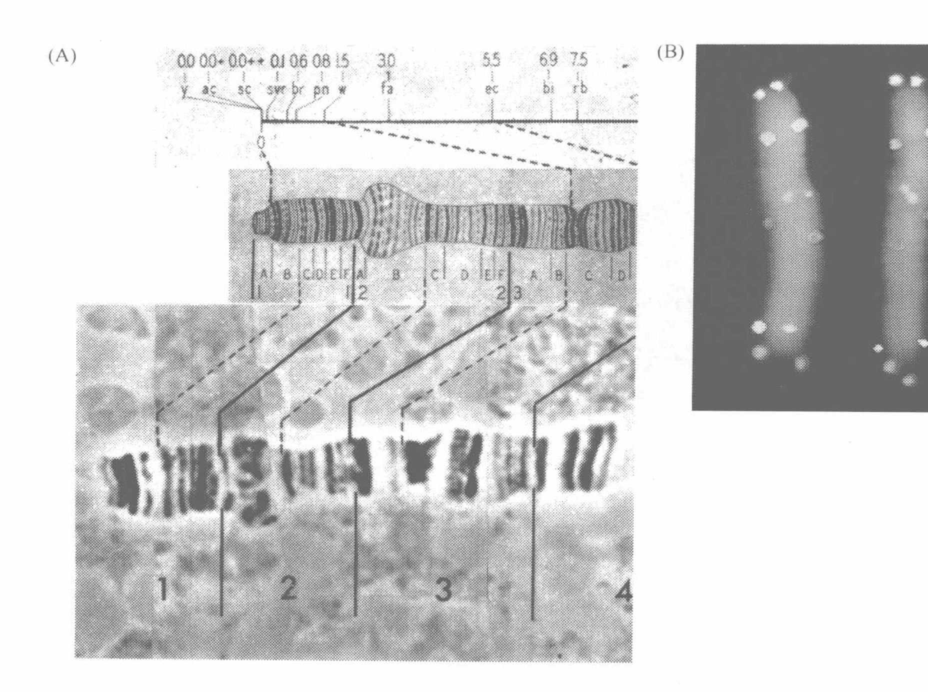


图 1.8 染色体上的基因定位 (A) 果蝇染色体的物理结构可以利用其唾腺染色体来绘制，该染色体呈现出由亮（疏松）、暗（紧密）染色体区域（下图）交替出现，产生带型。遗传杂交在线性遗传图谱上（上图）确定了数百个不同遗传位点的相对染色体定位。这些位点的定位随后与物理显带图谱对应起来，如同图中所展示的果蝇 1 号染色体左臂的起始部分。(B) DNA 探针能够与各种不同基因特异性杂交，使用一种特异性的荧光染料或者联合使用几种荧光染料对探针进行标记，能够在染色体上定位具体基因的位置。通过对中期染色体进行荧光原位杂交（FISH），人们在人类 5 号染色体上定位了 6 个基因的不同位点（每个基因都由两个点表示，因为染色体在有丝分裂中期以二倍体的形式存在）。(A，courtesy of M. Singer，and P. Berg，Genes and Genomes，Mill Valley，CA：University Science Books，1991，as taken from C. B. Bridges，J. Heredity 26：60，1935；B，courtesy of David C. Ward.)

程都在胎盘中完成）的细胞中存在两条相同的 X 染色体，它们的行为与非性染色体（**常染色体**）相似。但是在雄性中，X 染色体与 Y 染色体配对，其中 Y 染色体相对较小并且携带较少的基因信息。人类的 X 染色体约携带 900 个基因，而 Y 染色体仅携带 78 个不同的基因，这些基因由于存在冗余现象仅编码 27 种不同的蛋白质（图 1.9）。

性染色体结构上的不对称性使雄性处于生物学上的不利地位。很多对生命体的发育和功能至关重要的基因都位于 X 染色体上，而成对出现的 X 染色能够保证生物体更加健壮。即使其中一条 X 染色体上的基因拷贝存在缺陷（如没有功能的突变等位基因），存在于另一个 X 染色体上的基因拷贝也能够继续完成该基因的任务，以确保其正常的生物学功能。雄性的性染色体则缺乏这一自动防护故障系统。色盲症序列就属于此类基因，该疾病多发于雄性个体，因为编码视网膜色彩感应蛋白质的基因位于 X 染色体上。然而，这种性别之间的差异在某种程度上被自然缓解了（信息栏 1.2）。

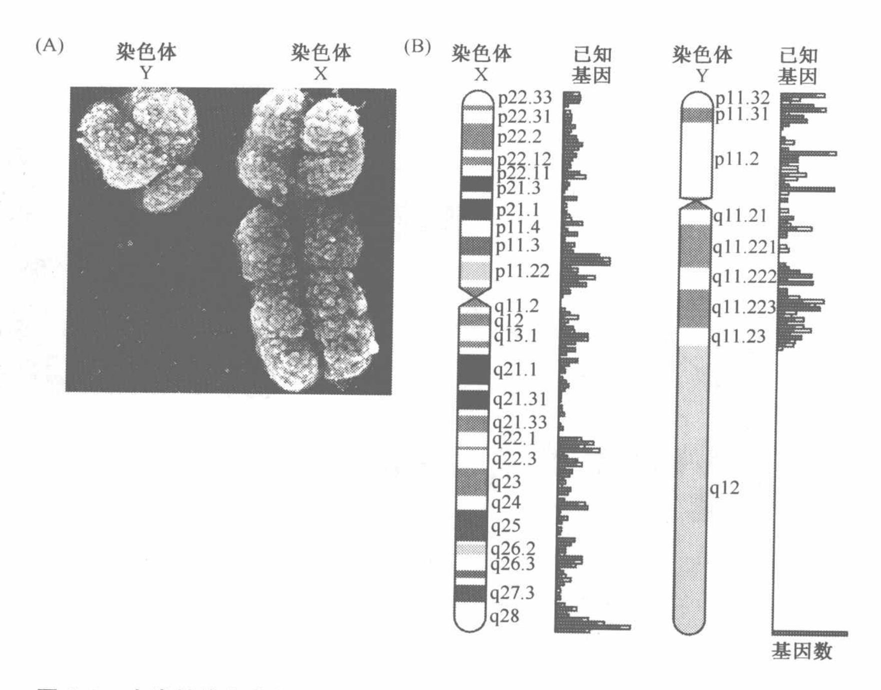


图 1.9 人类性染色体物理图谱 (A) 人类 X、Y 染色体电镜照片，与其余 22 对常染色体一样，均来源于人类基因组计划。(B) 此图将染色体细胞学图谱（对细胞周期中期染色体进行染色并显微检测得到）与具体的 DNA 序列相对应。人类染色体的短臂称为“p”臂，长臂称为“q”臂，每一条染色体都根据其不同的带型分成不同的区域，经序列分析的基因就是定位在这些区域里（染色体右侧柱状图）。已确定的基因用红色填充条表示，而那些待定的可能编码基因的序列用空白条示出。人类 Y 染色体约有 57 兆碱基 (Mb)，而 X 染色体上有约 155Mb。(A, courtesy of Indigo® Instruments; B, courtesy of The Wellcome Trust Sanger Institute.)

信息栏 1.2 雌性细胞只能从单个 X 染色体获取信息 在对性染色体的简单描述中，雄性细胞只能依赖于它的单条 X 染色体所携带的信息，而雌性细胞则可以参考它的两条 X 染色体。由于 X 染色体上存在着大量基因，这种不同将使雄性和雌性细胞间产生重要的生理差异。然而，这一问题能够由 X 失活机制解决。在胚胎发生早期，雌性胚胎细胞两条 X 染色体中的一条被随机地失活。失活将导致这条染色体丧失几乎所有的基因功能，而该染色体也将收缩成称为**巴尔体**的微粒（图 1.10）。随后，该类细胞的所有后代都将遗传这种染色体失活模式，继续携带同样失活的 X 染色体。因此，雌性携带 X 染色体相关基因的冗余拷贝的优势只是部分的。

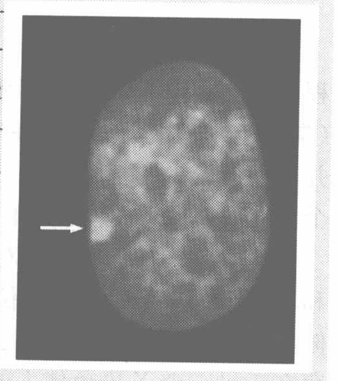


图 1.10 巴尔体样的 X 染色体 两条染色体中的一条在早期雌性胚胎细胞中随机失活，并且在其后代细胞中继续保持失活。可见有丝分裂间期细胞核中，继续保持浓缩状态，并且与核膜相连（白色箭头）。(From B. P. Chadwick et al., Semin. Cell Dev. Biol. 14: 359-367, 2003.)

色盲症的例子显示拥有两个基因拷贝确实能够保证生物学功能的维护。如果一个拷贝由于突变失活而丢失，尚存的基因拷贝往往能够编码野生型显性。这种功能性冗余存在于常染色体携带的绝大多数基因。正如我们稍后会看到的，这一机制在癌症的发展中起着重要作用，因为几乎所有防止细胞增殖失控的基因都以两个拷贝的形式存在于我们的细胞中，而只有当两个拷贝全部丢失时，才会引发其生长抑制功能的丢失和肿瘤细胞增殖的发生。

1.4　绝大多数癌症细胞的染色体都发生了改变

单个基因由于太小而不能通过光学显微镜进行观察，基因中的细微突变则更是如此。因此，在癌症中起作用的绝大多数突变并不能通过显微镜进行观测。然而，如果细胞基因组发生较大范围的改变就能够通过光学显微镜检测。这种改变早在 1914 年就被注意到了，特别是在癌细胞中。

我们现在了解到，癌细胞往往存在各种异常结构的染色体，如整条染色体的丢失，其他染色体副本的存在，以及一条染色体臂与另一条染色体臂的融合。整个染色体结构的变化拓展了我们对突变如何影响基因组的认识：由于染色体结构和数量的改变也构成了遗传改变，这些改变必将被看作是突变的结果（信息栏 1.3）。重要的是，在癌细胞中观察到的异常染色体提示这些细胞在遗传上可能是异常的，也就是说它们是突变体。

典型的状态。**整倍性**意味着每条常染色体都以正常结构成对存在，而 X 与 Y 染色体也以适合于性别的数目存在。整倍性染色体组的异常形式——**非整倍性**形式可见于许多癌细胞。非整倍性通常只是癌细胞一般混乱的结果。然而，非整倍性与肿瘤细胞增殖之间的关系暗示着一个观点：染色体额外拷贝的获得或者染色体的丢失能够创建出对癌细胞及其失控增殖有利的遗传结构。

信息栏 1.3　癌细胞通常是非整倍性的　在 20 世纪早期，人们就通过异常结构染色体的存在和染色体数目的改变发现，细胞基因型的改变通常伴随并且可能引发癌细胞不受控制的增殖。这些正常整倍性染色体组型的改变可以划分为许多类型。结构上看似正常的染色体可以堆积为额外的拷贝，导致肿瘤细胞核中出现这些染色体的三个、四个甚至更多的拷贝（图 1.11）；这种正常染色体数目的异常情况也是非整倍体的表现。

染色体可能经历多种结构上的改变，一段片段可能从一条染色体臂上断裂下来并且融合到另外一条染色体臂上，从而导致染色体的**易位**（图 1.11C）。或者，染色体片段可能在不同染色体对的染色体间交换，从而导致**相互易位**。一段染色体片段也可能发生倒转，这将影响位于断裂-融合位点附近的基因的调控（图 1.11D）。

此外，染色体的一段片段能够额外发生多次拷贝，所得到的拷贝首尾相连融合为一个同源染色区（homogeneously staining region，HSR）。染色体片段也可能被从染色体上切除，并且在核内扩增为很多拷贝，产生称为**双微染色体**（图 1.12B）的亚染色体片段。后面的两种变化导致这类片段中所携带基因的拷贝数量的增加。有时，两种形式的扩增共存于同一个细胞（图 1.12C）。这些**基因扩增**可以通过增加促生长基因的拷贝数以促进癌细胞的生长。

在某些情况下，一些生长抑制基因在癌细胞发育的过程发生缺失。例如，当位于染色体臂中部的片段发生丢失，而其两侧的染色体区域重新连接时，就构成了**中间缺失**（图 1.12D）。

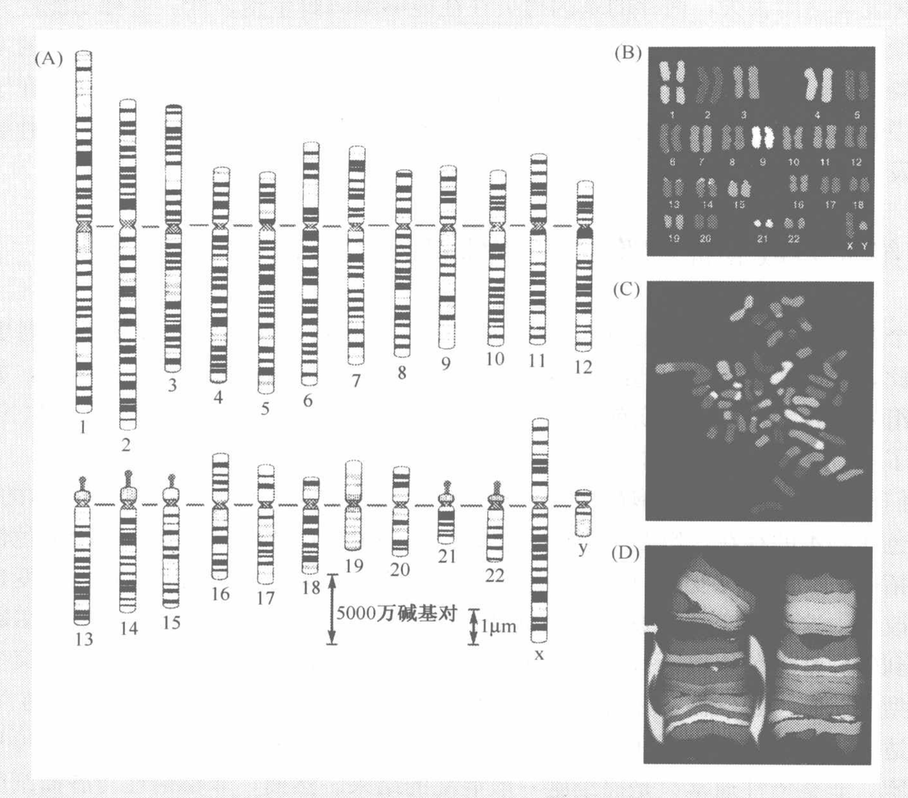
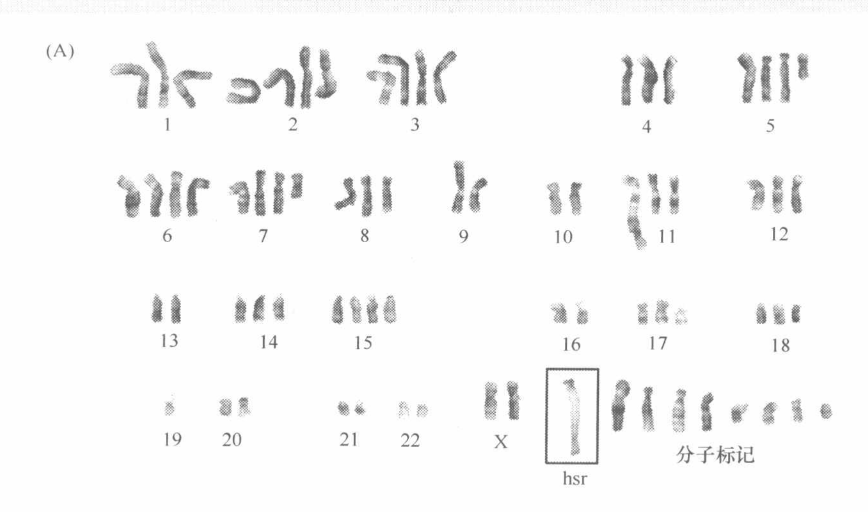


图 1.11　正常与异常的染色体补体　(A) 通过对中期染色体染色可以得到每条染色体特征性的明暗带型，这里以示意图的形式显示出全套的人类染色体。(B) 光谱染色体组型 (SKY) 分析技术和 M 带荧光原位杂交 (mFISH) 技术，使得实验者能够用不同的颜色绘出每条中期人类染色体（使用不同荧光染料标记特异性 DNA 探针，并将其与染色体杂交)。图像中显示的颜色是由计算机生成的。这里呈现的是人类正常细胞的二倍体染色体组型。(C) 图示为人类乳腺癌细胞的非整倍性染色体组型，其染色体以不适当的数量存在并且存在一些移位（染色体间的片段交换)。(D) 图中所示染色体存在于一位前苏联核武器工业工人的细胞内，该工人曾经暴露于放射性元素钚。研究者运用 mFISH 技术用特异性荧光染料对染色体内部的亚区进行标记，结果显示正常 5 号染色体臂的绝大部分（右侧）发生了倒转（左侧)。(A, adapted from U. Francke, Cytogenet. Cell Genet. 31: 24-32, 1981; B, from E. Schröck et al., Science 273: 494-497, 1996. © AAAS; C, courtesy of J. M. Davidson and P. A. W. Edwards; D, from M. P. Hande et al, Am. J. Hum. Genet. 72: 1162-1170, 2003.)



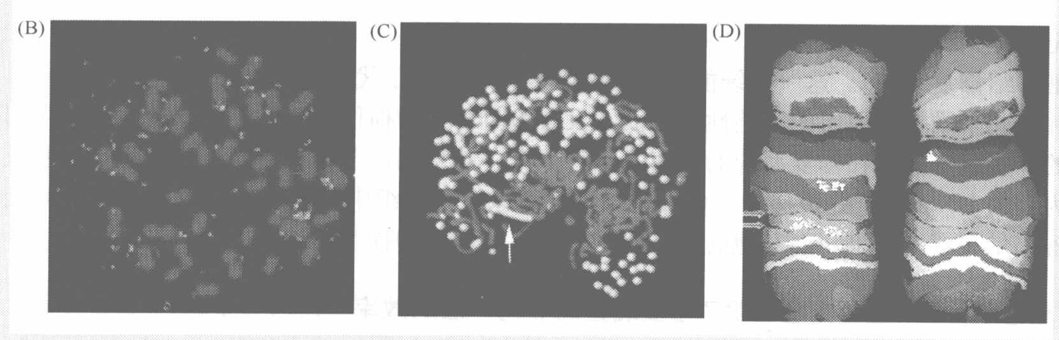


图 1.12 染色体片段拷贝数的增加和减少 (A) 吉姆萨染色液能够显示染色体区域正常区带的改变。同源染色区（HSR）的出现是由于一段染色体片段复制的重复进行，复制产生该片段的很多串联拷贝并且伴随其基因拷贝数量的增大。这里展示的是发现于人类肝癌细胞中的一个同源染色区（HSR)。(B) 双微染色体（DM）是由脱离正常位点的染色体片段得来的，并且可以作为染色体外遗传因子被反复的复制；如同正常染色体的染色单体，这些结构在有丝分裂中期也会发生倍增。图中显示的是含有扩增的 *HER2/Neu* 癌基因拷贝的小鼠乳腺癌细胞，这些拷贝位于与染色体（红色）不相联系的双微染色体（黄色）上。该双微染色体是通过 FISH 法运用结合于该癌基因的探针检测到的。(C) 有时，一个扩增的基因可以同时存在于染色体内的同源染色区和双微染色体。这里对人类神经内分泌肿瘤细胞 COLO320 进行分析，结果显示染色体（红色）中存在 *myc* 癌基因（黄色）的多拷贝。图中的箭头指示 HSR，可见细胞中同时存在大量 DM。(D) 使用 mFISH 技术分析显示，在暴露于钚的辐射（左侧成对的箭头）后，人类正常 5 号染色体（右侧）的一个片段发生了丢失（中间缺失）。（A，from J-M. Wen et al.，Cancer Genet. Cytogenet. 135：91-95，2002；B，from C. Montagna et al.，Oncogene 21：890-898，2002；C，from N. Shimizu et al.，J. Cell Biol. 140：1307-1320，1998；D，from M. P. Hande et al.，Am. J. Hum. Genet. 72：1162-1170，2003.）

1.5 引发肿瘤的突变影响生殖细胞和体细胞

突变能够改变基因包含的信息内容，而突变的等位基因能够由亲代传递到子代。这种由上一代至下一代的传递由生殖细胞（精子或者卵子）执行，因此又被称为发生于生殖**细胞系**。重要的是，突变的等位基因在种系内向后代的传递只有在满足下列条件时才会发生，那就是相应的突变必须发生于精子或者卵细胞基因组所携带的基因，或者发生于生殖腺中精子或者卵细胞的直接前体细胞的染色体组中。体细胞染色体中发生的突变也可能影响到一些细胞，但是此类突变不会传递给其后代。因为这种体细胞突变不能进入代与代之间遗传传递的运载工具——精子或者卵细胞的染色体。

体细胞突变在癌症形成的过程中起重要作用。正如本书中反复提到的，一个体细胞突变能够影响整个细胞的行为，而在细胞不断生长和分裂的过程中，该突变能够被传递给其每一个后代细胞。单个祖代细胞最终可能产生数百万甚至数十亿个后代细胞，并且构成一个细胞**克隆**。

每个细胞中都存在精细的细胞修复系统，它们不断监护着细胞的基因组，一旦发现突变序列就用适当的野生型序列对其进行替换（见信息栏 1.4；我们将在第 12 章中详细介绍修复系统）。这一系统能够将破坏基因组和传给子代细胞的突变数量保持到最低，并以此来维持基因组的完整性。然而，没有绝对可靠的损伤检测和修复系统。遗传序列的一些突变能够在修复系统的细察下幸存下来，并且固定于细胞基因组中，随后复制成为新的 DNA 分子并传递给后代细胞。这就意味着基因组中积聚的大部分突变是修复装置偶尔失察的结果，而其他的则是修复系统不能修复的损害的结果。

信息栏 1.4 生殖克隆证明了修复装置的非同一般的效率 DNA 修复复合体的效率（见第 12 章），体细胞突变导致的抑制及体细胞基因组的整合，都由近几年成功的动物克隆所证明。在多利羊的明星案例中，细胞取自其母亲的乳腺组织，将其细胞核取出后植入被提前去核的卵细胞。所得到的细胞含有供体的细胞核和受体卵的细胞质，随后诱导其增殖形成胚胎（图 1.13）。几个月

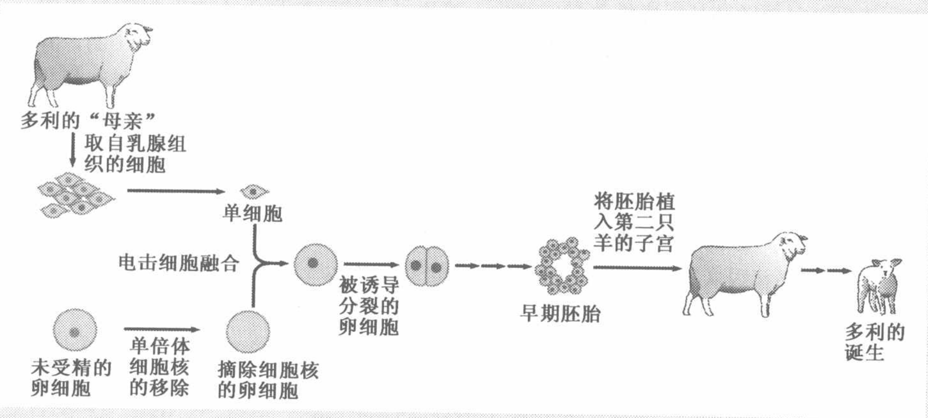


图 1.13 生殖克隆过程中的克隆和基因组整合 去除受精卵中的细胞核，并将体细胞的细胞核植入其中。所得到的二倍体细胞在形式上等同于受精卵，从而能够被诱导分裂成为胚胎，随后被植入代孕母亲的子宫中，发育成为一个新的生命。这一健康新生命的诞生表明，作为捐赠者的体细胞携带该物种的完整基因组。

后，一只基本正常的羊——多利诞生，这个事实证明其母亲的乳腺细胞的基因组不携带危及胚胎发育的突变。

这种乳腺细胞基因组所潜在具有的完整性使大家把注意力集中到了多利母亲的生命发育历程上，特别是它如何从胚胎发育而来。在从最终成为多利母亲的受精卵到多利母亲乳腺组织的发育过程中，受精卵的基因组在细胞生长和分裂中发生无数次的复制。这一不断复制的过程包含DNA复制和消除DNA序列突变的修复复合体，从而能够高效保留体细胞基因组的完整性，进而能够保证正常组织的发育。

1.6 在DNA序列信息中体现的基因型通过蛋白质决定表型

孟德尔遗传学中对基因的研究基本上是数学的抽象概念，其解释了基因的传递，但是并没有指明它们如何创造细胞和生命的表型。表型的属性包括从复杂的遗传学行为特点到细胞和亚细胞器的形态学（形状、形式）到细胞代谢的生物化学。基因型如何决定表型这个谜是20世纪生物学研究的主要问题。因此在20世纪后半叶以及随后的21世纪，很多分子生物学家都致力于建立两者之间的联系。

分子生物学为理解这种联系提供了概念上的支持。在1944年，DNA被证明是携带细胞遗传信息的化学实体。9年后，Watson和Crick阐明了DNA分子的双螺旋结构。12年后，也就是1965年，人们认识到DNA双螺旋结构中的序列决定了蛋白质的氨基酸序列，而细胞中每种蛋白质的独特结构和功能都由其氨基酸序列决定。因此，由DNA分子碱基序列决定的氨基酸序列为蛋白质的构建提供了所有信息。

蛋白质在细胞内合成完毕后，就开始通过多种途径创建表型。蛋白质能够在细胞内汇集以便创建复杂的结构，这些结构通常被称为细胞结构（图1.14A，B）。当被分泌至细胞之间的空间时，这种复杂的结构又被称为**胞外基质**（ECM）；它能够将细胞连接起来形成复杂的组织（图1.14C，D）。正如我们下面将看到的，ECM的结构经常被恶性肿瘤细胞破坏，从而使肿瘤细胞能够迁移到组织和生命体的内部，这在正常情况下是达不到的。

很多蛋白质具有酶的功能，催化代谢过程中的数千个生化反应；如果没有这些酶的有效介入，**代谢反应**很少能够自发发生。蛋白质还能够收缩并且建立肌收缩和细胞运动（**运动性**）。细胞的运动性也在癌症的发展中起一定的作用，它能够使癌细胞散布于整个组织甚至迁移到相距很远的器官。

最重要的是，在癌症形成的过程中，蛋白质能够改变细胞之间的信号，由此使复杂组织能够保持适当数量的各种类型重要细胞。在单个细胞中，某一蛋白质从一处接收到信号，处理这些信号并且将其传递给细胞中的其他蛋白质；这种信号传递功能通常称为细胞内**信号转导**，也在癌症的发生中起重要作用，因为肿瘤细胞的异常生长大多由细胞内信号转导分子的异常功能引起。

蛋白质功能的多样性显示细胞和生命的各方面表型都可以由蛋白质的作用来完成。一旦我们认识到这一点，就可以用最简单的分子术语来描述基因型和表型：基因型信息存在于DNA分子的碱基序列中，而表型则由蛋白质的作用得到（实际上，这一描述是过于简单化的，因为它忽略了RNA分子作为DNA序列与蛋白质结构之间中介物的重

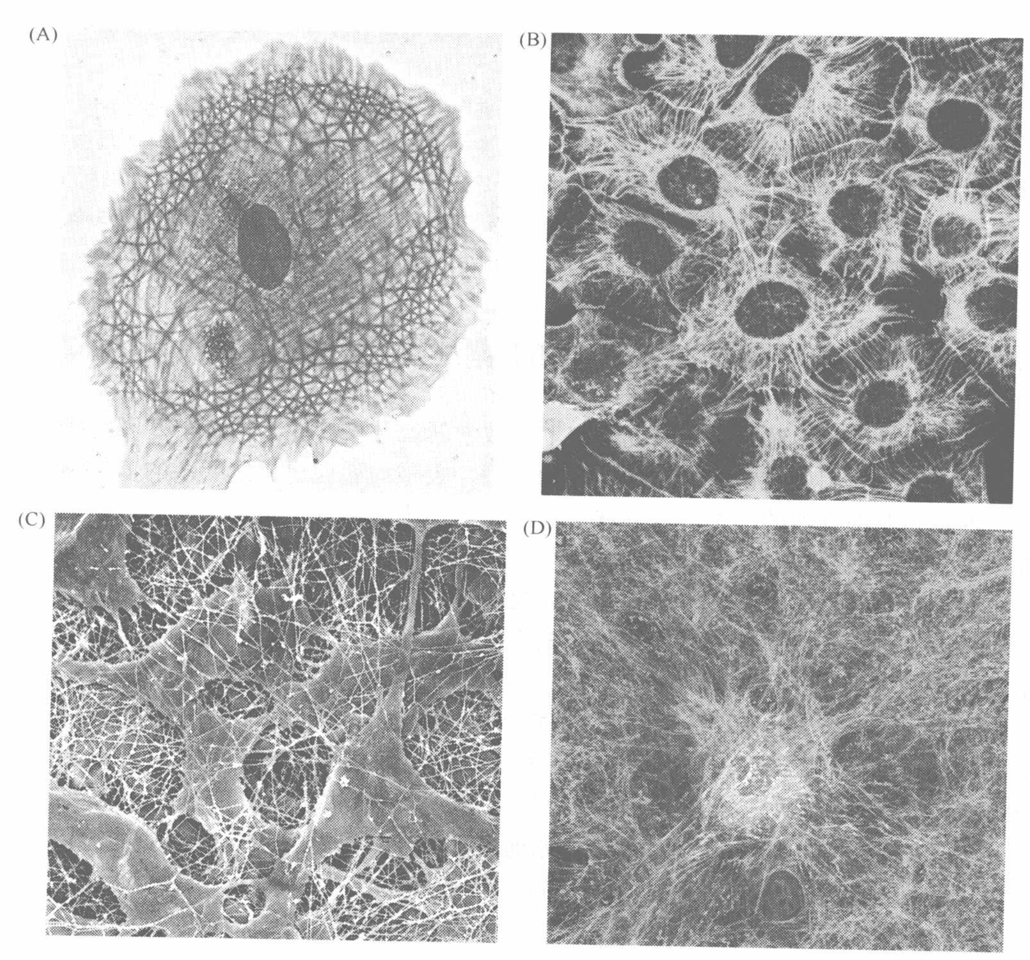


图 1.14　细胞内与细胞外的支撑结构　（A）细胞骨架由中间纤维、肌动蛋白及微管的复杂网络结构装配而成。它们共同作用产生细胞的形态并使其能够运动。（B）图示为运用角质素特异抗体（绿色）检测到的上皮细胞中角质素——一种重要的中间纤维。细胞的边缘用第二抗体标记，该抗体与细胞膜蛋白（蓝色）发生反应。（C）细胞能够分泌出一系列不同的蛋白质，它们在胞外组装为细胞外基质（ECM）。扫描电镜的结果显示出由胶原纤维、糖蛋白、透明质烷以及蛋白聚糖构成的复杂网状组织，其中还镶嵌着成纤维细胞（结缔组织细胞）。（D）NIH3T3细胞，该细胞系在癌细胞生物学研究中有广泛的应用。图中显示其位于纤维结合素纤维（绿色）的 ECM 网状结构中。细胞与纤维结合素接触的位点是由细胞表面（橙色、黄色）的整联蛋白受体介导的。（A，courtesy of Colin Smith；B，courtesy of Kathleen Green and Evangeline Amargo；C，from T. Nishida et al.，Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29：1887-1890，1988. © Association for Research in Vision and Ophthalmology；D，from E. Cukierman et al.，Curr. Opin. Cell Biol. 14：633-639，2002.）

要作用，忽略了新近发现的特定 RNA 分子具有酶的功能以及其作为特定基因表达的调控器的重要作用）。

如同在较为简单的细菌**原核细胞**中一样，动物细胞的 DNA 序列在转录过程中也复制为 RNA 分子；一个正在发生**转录**的基因被称为是活跃**表达**的基因，而不转录的基因

则被认为是受到**抑制**的。在最简单的转录过程中，一个基因能够转录产生同等长度的RNA分子，RNA分子一旦被合成，其中的碱基序列就被**核糖体翻译**成为氨基酸序列。所得到的大分子可能包含数百甚至数千个氨基酸，并且卷曲成为独特的三维结构，形成有功能的蛋白质（图1.15）。

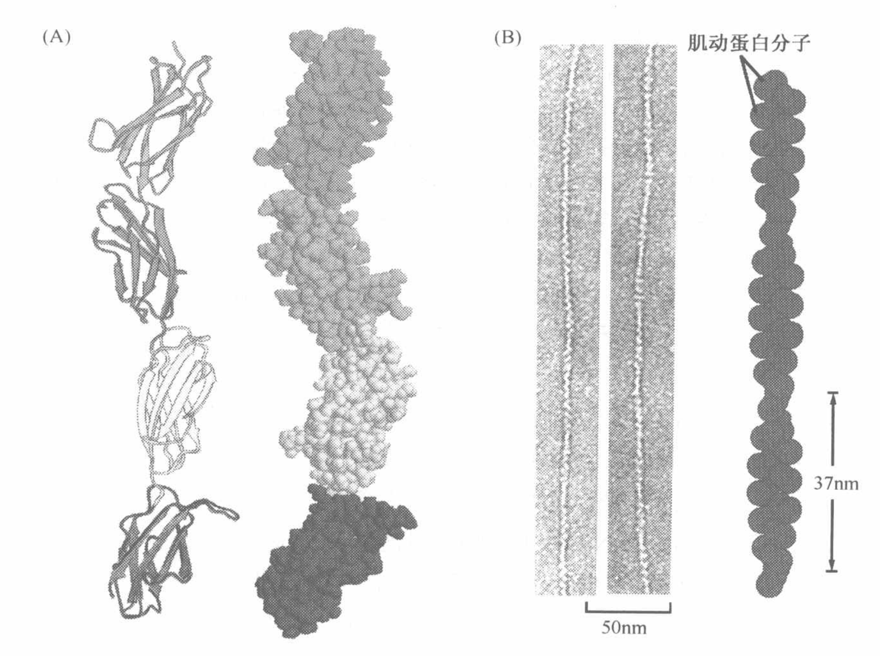


图1.15 蛋白质和多蛋白聚集体的结构 （A）纤连蛋白是一种重要的胞外基质蛋白（见图1.14），其部分三维结构可以用带状图来表示（左图），以演示构成该蛋白质的氨基酸链的走向；或者，可以在空间结构模型中（右图）表示出单个原子的位置。纤连蛋白的一个结构域是由4个结构相似的亚基构成的，这4个亚基在图中用4种不同的颜色表示出来。（B）肌动蛋白（左图）是细胞骨架（见图1.14）的重要组成部分，是由蛋白质分子聚集组成的，在图中用不同的双叶状小体表示（右图）。（A，adapted from D.J. Leahy，I. Aukhil，and H.P. Erickson，Cell 84：155-164，1996；B，(left) courtesy of Roger Craig，(right) from B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.）

蛋白质的**翻译后修饰**使某些化学基团与蛋白质链中特定的氨基酸残基共价结合；这些修饰主要包括磷酸化、糖基化及乙酰化（见信息栏1.5）。另一种同样重要的翻译后修饰是**蛋白酶**对蛋白质的切断，该酶具有在特定位点切断氨基酸链的能力。相应的，最终得到成熟形式的蛋白质比最初合成的形式更短一些。随着合成的完成，很多蛋白质被指派到细胞内的特定位置，或者被分泌至胞外。

信息栏1.5 人体中存在多少中不同的蛋白质？ 虽然有人尝试评估出人类基因的总数（略多于22 000个），但是想要从中推测出人类基因组所编码的不同蛋白质的总数仍然非常困难。最简单的评估方法是假设每个基因都仅仅编码一种蛋白质。但是，这种假设是过于简单的，因为它忽略了由一个基因转录得到的pre-mRNA可能具有几种**选择性拼接模式**，从而最终得到多种不同结构的mRNA，编码不同的蛋白质（见图1.16）。因此，在某些细胞中，某一基因产生的mRNA分子可

能包含一些外显子，而在另一些细胞中，这些外显子却被剪切了。这种可能的拼接模式能够产生不同结构的 mRNA 和蛋白质编码序列。其中一个最极端的例子是，人们发现某个果蝇基因通过各种不同的 pre-mRNA 拼接机制能够产生 38 016 种不同的 mRNA 及蛋白质。我们人类的基因组中也同样存在具有复杂拼接机制的基因。

另外一个层面的复杂性源于蛋白质的翻译后修饰。转运至细胞表面的蛋白质和以可溶性形式释放至胞外的蛋白质在**糖基化**过程中通常被修饰添加各种糖模块，而胞内蛋白质则通常经历其他类型的化学修饰。存在于控制细胞增殖的信号转导通路中的蛋白质通常被**磷酸化**，磷酸基通过共价键与丝氨酸、苏氨酸或者酪氨酸残基相连。磷酸化通常会影响这些蛋白质的某些功能。同样，围绕在 DNA 周围、控制 RNA 聚合酶合成 hnRNA 的组蛋白则通常遭受**乙酰化**修饰，以及更加复杂的翻译后修饰。

构成蛋白质的多肽链在其合成后也可能在特定的位点发生断裂，并且通常会产生较小的蛋白质，并且显示出与前体蛋白质不同的功能。随后我们将描述信号是如何通过蛋白酶的作用而在细胞中传递的。在这些情况下，蛋白质 A 可能会切割蛋白质 B，从而激活其蛋白酶活性；由此获得的蛋白质 B 则可能进一步切割蛋白质 C 等。总的来说，选择性拼接和翻译后修饰产生了更多不同的蛋白质分子。

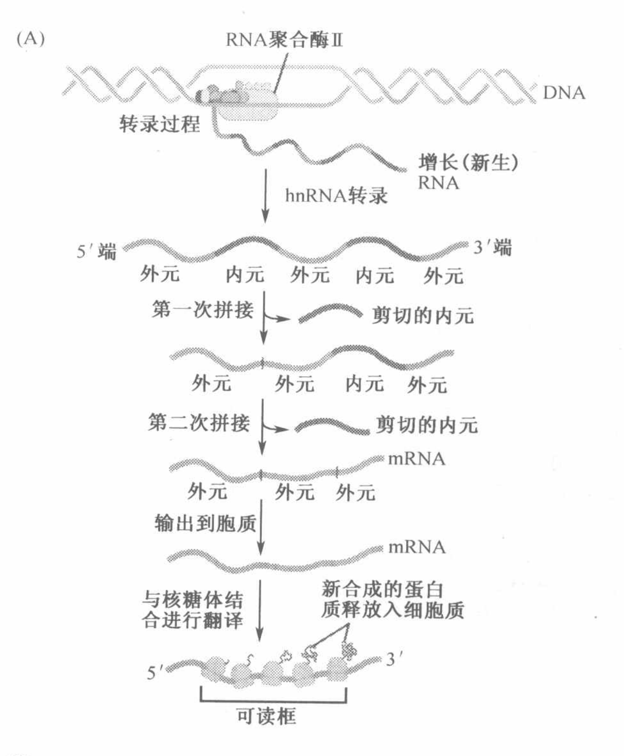
在真核细胞中，RNA 合成是一个复杂的过程。在转录为 RNA 分子的最初阶段，其长度与亲本基因的长度大致相等。然而，在其合成后不久，或大或小的 RNA 分子片段就被从最初合成的分子中切除下来。这些片段称为**内含子**，对 RNA 分子的编码能力并不产生影响（图 1.16）（实际上，RNA 分子的编辑可能在其合成的同时就已经发生了）。

每个内含子两侧的保留序列称为**外显子**，它们在**拼接**过程中重新连接在一起。最初合成的 RNA 分子以及在**拼接**各个阶段发现的其衍生物，与其他基因的核 RNA 转录物共同构成 hnRNA（核不均一 RNA）。转录后修饰的最终产物可能仅仅是其 **hnRNA** 前体的一个小小的片段。成熟的 RNA 分子随后被导出进入细胞质成为 **mRNA**（信使 RNA），其作用是作为模板在核糖体聚集氨基酸，并且最终合成蛋白质。某些成熟 mRNA 的长度甚至不及其 **pre-mRNA** 的 1%（pre-mRNA 通常指细胞质 mRNA 的前体-hnRNA）。RNA 转录后修饰和蛋白质翻译后修饰的复杂性，使细胞中产生了大量不同的蛋白质（见信息栏 1.5）。

1.7 基因表达方式也决定表型

在哺乳动物基因组中存在 22 000 个左右的基因，它们在单个细胞中协同作用创造出哺乳动物的复杂表型。21 世纪生物学的最重要目标就是找出这些基因的功能与生命体生理学、发育生物学和疾病发生之间的关系。然而这个问题具有相当的复杂性，因为在哺乳动物体内存在数百种不同的细胞类型，每一种细胞都具有独特的行为、代谢作用和生理特征。

这种复杂性是在生命体发育过程中获得的，因此该研究属于发育生物学的范畴。这些发育生物学家一直致力于研究关于所有多细胞生物体组成的固有问题。动物体的所有细胞都是其受精卵的直系后代，并且，所有这些细胞所携带的基因组都是受精卵中基因组的精确拷贝（见信息栏 1.4）。而事实上，动物体不同细胞的表型具有极大的差异（如皮肤细胞与脑细胞之间），这种遗传学上的相同性引出了一个发育生物学的中心问



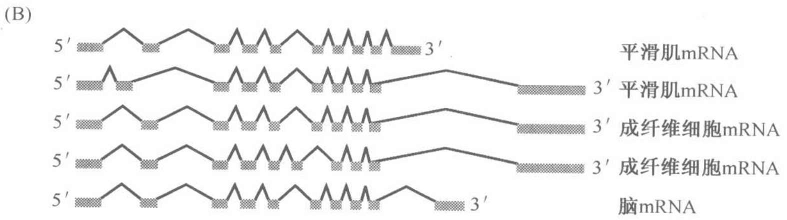


图 1.16　前体 mRNA 的加工　（A）RNA 聚合酶 II 通过合成 DNA 链的互补 RNA 拷贝来构成核不均 RNA（hnRNA)(红色和蓝色）。这些 hnRNA 被称为前体 mRNA。在逐步去除内含子（红色）后，成熟的 mRNA 将只含有外显子（蓝色）。（B）一条前体 mRNA 可能通过多条不同路径进行拼接，从而得到不同的成熟 mRNA，编码不同的蛋白质分子。图示的是 α-原肌球蛋白前体 mRNA 的选择性拼接模式，其 mRNA 产物能够编码细胞（和肌肉）收缩的重要元件。在该图中，内含子由黑色插入符表示，外显子由蓝色矩形表示。（B，adapted from B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.）

题：如果肌体细胞都携带相同的遗传模板，那么各种细胞型是如何获得不同表型的？在过去的三个世纪中我们一直在探寻该问题的答案，并最终发现其主要原因是由于各种类型细胞对基因组的选择性表达（图 1.17）。

随着早期胚胎中的细胞不断的生长与分裂，位于胚胎中不同部位的细胞开始聚集出现不同的表型，这一过程称为**分化**。分化的细胞开始定型形成特定类型的组织而不是其

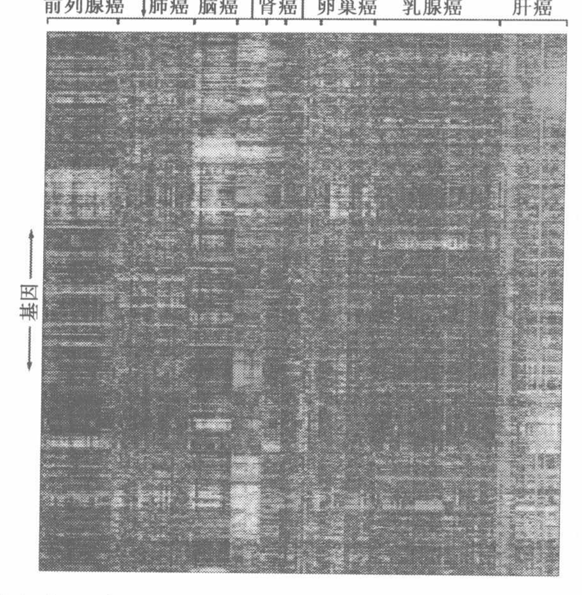


图 1.17 基因表达微阵列的全面调查 基因表达微阵列的发展使人们能够研究细胞中数百甚至数千个基因的表达水平。在本图中，高于平均水平的表达均显示为红条，而低于平均水平的则显示为绿条。研究者对 142 种不同人类肿瘤（由左至右排列）的 mRNA 进行分析。在每一种情况下，分别对 1800 个选定的人类基因的表达水平进行了测定（由上到下）。可见每种肿瘤都有其基因的特征表达谱。在该情况下，一种未知类型的肿瘤（黄色标记）被判定为肺癌，因为其基因表达模式类似于一系列已鉴定的肺癌。（Courtesy of P. O. Brown，D. Botstein and The Stanford Expression Collaboration.）

他组织（如形成肠组织而不是神经系统）。与此同时，它们将始终保持相同的基因组。这种差异将引出一个简单的结论：人们迟早会发现，分化现象的出现是由于一些基因在某些细胞中有表达而在另一些细胞中没有表达。

通过在一些特定的细胞中表达，一组基因编码合成一组蛋白质，而这些蛋白质最终协同创造出一种特定的细胞表型。因此，机体中每种分化细胞的表型在原则上可以通过在该细胞中表达的特定基因亚型来理解。

哺乳动物细胞中的基因可以划分为两大类——**管家基因**和**组织特异性**基因。很多基因所编码的蛋白质被广泛需要以维持机体中所有细胞的生存，或者维持所有细胞共同拥有的某种生物学功能。这些共同表达的基因被划分为管家基因。在给定的分化细胞中，绝大多数的表达基因都是管家基因。

分化细胞中少量存在的基因——组织特异性基因，则专一性的产生该细胞特异性的蛋白质及表型。例如，在给定的分化细胞中，有 10 000～15 000 个管家基因表达，而仅有不到 1000 个组织特异性基因能够编码细胞不同的、分化的特性。在每种分化的细胞中，基因组中有 20 000 个左右的基因并不表达，因为它们对于细胞特殊的分化过程或者普通的管家目的并不是必需的。

1.8 调控基因表达的转录因子

前述的分化表明，细胞要表现出复杂的、组织特异性的表型需要一系列基因的协同表达和抑制另一些基因的表达。这种协同表达是**转录因子**（TF）作用的结果。这些蛋白质结合于基因调控区的特异性 DNA 序列，从而决定基因是否表达。TF 结合的核酸序列通常称为**序列基序**，长 5～10 个核苷酸。一些 TF 为 RNA 聚合酶提供了基因转录的机会，而另外一些 TF 则可以阻断这种通路，以确保该基因的转录被抑制，其分子机

制还不完全了解。

基因的调控区包含一系列短的DNA核苷酸序列，这些序列可以被特异性的转录因子识别和结合以精确调控转录的过程（图1.18）。这些短的DNA序列（**增强子**）的存在或缺失决定了转录因子是否能与基因的调控区结合从而进行调控。调控区通常位于基因转录起始位点的上游。此外，转录起始位点周围的一段序列称为**启动子**，该位点能够与RNA聚合酶II和一系列的转录因子结合。因此，一个基因可以分为两个重要的功能区——非转录的调控区和出现于pre-mRNA及mRNA的转录区。在很多基因中，增强子序列也可能分散于基因的转录区，通常是在内含子部分。

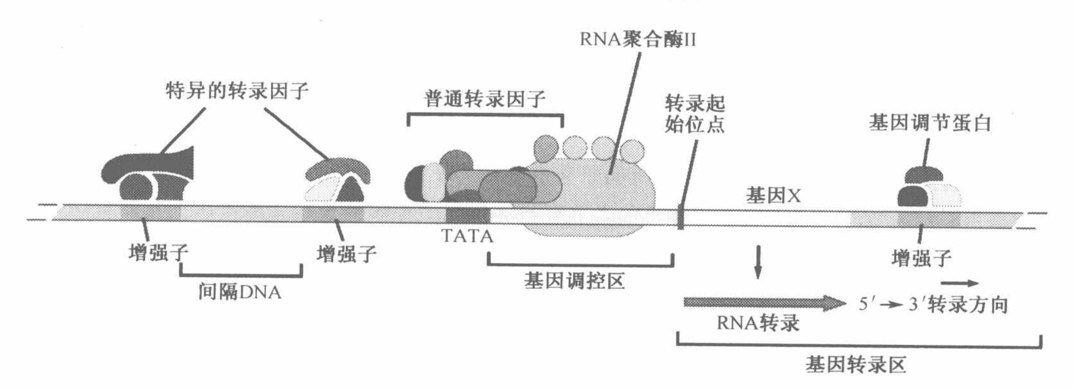


图1.18 基因表达的调控 基因的调控区包含基因调控蛋白（转录因子）结合的特异性DNA片段（淡绿色），而这些转录因子通常以多蛋白复合体的形式存在。此外，基因的启动子序列（暗绿色、黄色）包含RNA聚合酶II和相关转录因子共同结合的区域。结合的转录因子可能会影响染色质的结构（特别是组装染色体DNA的组蛋白），从而创建特定的环境使聚合酶II能够起始和延伸RNA的转录（蓝色箭头）。（普通的转录因子通常作用于基因组中很多基因的转录起始，而特殊的转录因子则能够调控小量基因亚型的表达。）一些调控序列可能定位于基因的转录区域。（From B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.）

转录因子可能同时影响一大类下游应答基因的表达，而每个基因都在其启动子区域含有这一因子的识别序列（增强子）。一种转录因子引发细胞或器官多种改变的能力通常称为**多效性**。在肿瘤细胞中，一个失活的、多效性的转录因子可以同时协调一大类应答基因的表达，使其共同作用以创建癌细胞的表型。

绝大多数基因的转录依赖于几种不同TF的共同作用，其中每一种TF都必须位于基因启动子中或者周围的适当位点，并且必须协同作用以激活基因的表达。这些相互作用引发了另外一种观点——基因表达通常是几种TF共同作用的结果。因此，细胞中多种基因的共同作用通常称为基因**表达程序**，依赖于多种TF在大量基因启动子上的共同作用。

1.9 组成多细胞动物的生物大分子在长期进化过程中是高度保守的

这些细胞生物学、遗传学和进化的描述部分来自于我们对地球上生命历史的认识。多细胞动物可能在7亿年前就出现在这个星球上。一旦胚胎开始发育，而这些重要机制开始控制它们的遗传、生化，那么这些机制在以后的几代中，甚至至今都将大致保持不变。不同动物门类中共有的这些保守性质深化了肿瘤研究的结果，因为很多通过研究更

加原始、在遗传学上更具有延展性的生命体获得的认识，例如，很多通过研究苍蝇和蠕虫所得到的结论都被证实同样适用于哺乳动物（包括人类）组织的发育和功能。

通过观测哺乳动物类中不同的生命体，人们发现它们之间的生物化学和细胞生物学方面的差异是非常小的。由于这些原因，我们将在本书中来回交叉描述鼠生物学和人类生物学，并且假设两者在本质上是相同的。当种属特异性的差异非常重要时，这些差异将被指出来。

细胞中复杂的信号通路似乎在所有哺乳动物细胞中都以相同的形式存在。令人更加震惊的是其组成元件的互换性。人类蛋白质不能够代替其在鼠细胞中同源蛋白质起作用是非常罕见的（见信息栏 1.6）。在很多种蛋白质中，这种功能和结构上的保守性也证明了蛋白质能够在进化关系较远的有机体之间互换。其中最显著的案例见于图 1.7，是编码哺乳动物和苍蝇眼睛的基因及其蛋白质。

信息栏 1.6　同源物与同系物　所有高等脊椎动物（鸟类和哺乳动物）似乎都具有数目相对较大的基因，约 25 000 个，鸟类基因组中几乎所有的基因似乎都能够在人类基因组中找到密切相关的对应基因。鼠与人类基因间的对应性也非常强，显示出这两种哺乳动物在进化关系上具有较近的亲缘性。

在每个物种的基因组中都存在这样的基因，它们所包含的信息和编码的相关蛋白质结构与另外一种相似。这些基因就形成了基因家族。例如，在人类基因组中编码珠蛋白的一组基因就构成了这样一个**基因家族**。这些相关基因出现于进化过程的同一时间，由一个已存在基因在不断的复制过程中与其对应基因日趋发生歧化而产生（图 1.19）。与同物种或者不同物种基因组中的基因相似的基因称为彼此具有**同源性**的。通常人类基因可以在另外一个物种中找到精确的复本。这两种密切相关的基因称为彼此的**正向同源**基因。因此，人类 *c-myc* 基因的正向同源基因是鸡的 *c-myc* 基因。在人类基因组中存在其他的类似于 *myc* 的基因（如 N-*myc* 和 L-*myc*），它们同属于 *c-myc* 基因家族，但并不是彼此或者鸡 *c-myc* 基因的正向同源基因。

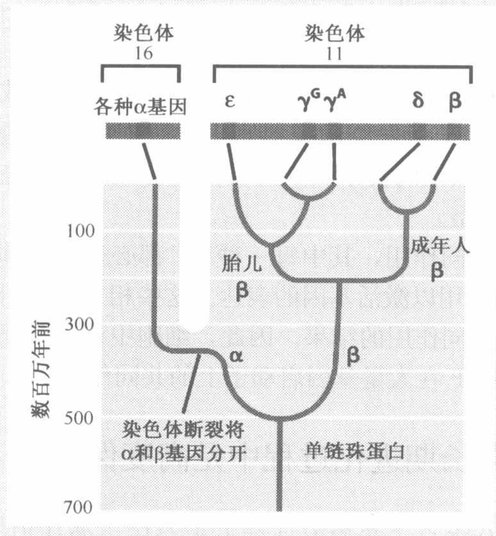


图 1.19　基因家族的进化发展　机体复杂性的演化，部分原因是由于蛋白质的生理功能日益的特异化。新蛋白质很大程度上是通过基因复制所产生的两个基因的歧化进化获得的。基因不断复制而产生的歧化能够导致大量多基因家族的产生。图中所示的祖先珠蛋白基因能够编码血红素的蛋白质组分，它在脊椎动物的进化过程中不断复制，导致人类两条染色体上存在大量不同的珠蛋白基因。这些珠蛋白具有不同的氨基酸序列，它们所发挥生理学功能也各不相同。（From B. Alberts et al.，Essential Cell Biology，2nd ed. New York：Garland Science，2004.）

我们在本书中提到基因时，通常不会提及其被分离时所处的物种。这样做是因为在绝大多数情况下，小鼠基因的功能与其在人类或者鸡中的正向同源基因的功能是难以区别的。

1.10 基因克隆技术为针对正常和肿瘤细胞的研究带来革命性变化

直到 20 世纪 70 年代中期，对哺乳动物的分子水平分析主要局限于对 DNA 肿瘤病毒基因组的研究，对病毒的研究将在随后的第 3 章中描述。这些病毒在每个细胞中都具有很高的拷贝数（如分子数量），并且通常含有相对简单的基因组。这就使得生物学家能够快速纯化和研究病毒基因的详细结构和功能，这些基因在其宿主体内行使类似于宿主基因的功能。相比之下，对细胞基因的分子水平分析基本上是不可能的，因为它们数目众多（每个单倍体基因组中有数万个）并且通常嵌入复杂的基因组中（每个单倍体基因组中包含 3200 万个碱基对）。

这一切都随着基因克隆技术的出现而发生改变。此后，细胞基因组能够被片段化和创建**基因组文库**。各种 DNA 杂交技术能够被用于鉴定基因文库中研究者感兴趣的基因组片段，特别是携带部分或者整个被研究基因的 DNA 片段。将这种片段从基因文库中回收，并将其大量扩增能够得到纯化的、**克隆**的 DNA 片段，该片段称为克隆基因（图 1.20）。

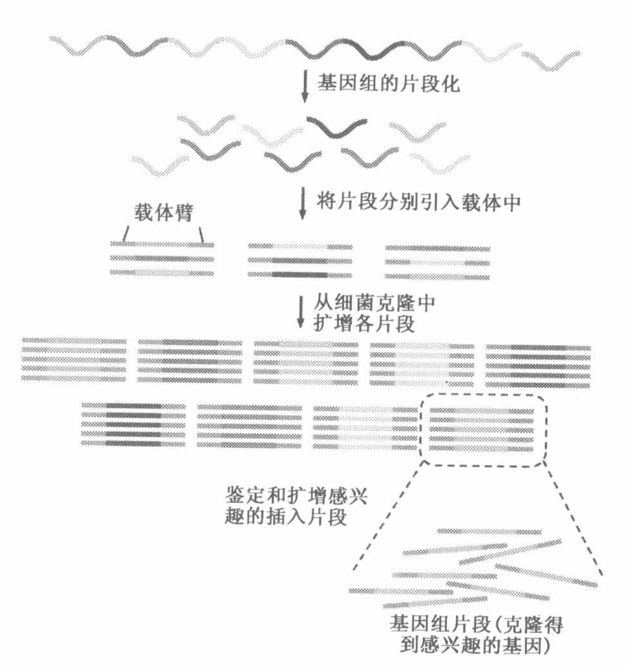


图 1.20 基因的分子克隆 自从 20 世纪早期和中期分子克隆技术发明以来，多种不同的克隆技术相继发展起来。这里显示的是其中一种方法的流程，通过该方法能够将一段特殊的 DNA 片段（包含感兴趣的基因）从复杂的基因组中分离出来。基因组首先被切割为相对较小的片段，通常是几万个碱基长度（上端）；将每个 DNA 片段都连入特定的载体（灰色）以构建重组载体；每个含有插入基因片段的阳性载体都被扩增为细菌克隆，对包含感兴趣基因的阳性克隆进行鉴定后回收其中的基因，就能够得到该片段的数百万个拷贝（右下端）。

其他技术则用于获得 mRNA 的 DNA 拷贝，mRNA 在细胞核中合成，而后转入细胞质中，是蛋白质合成的模板。**反转录酶**（RT；见信息栏 3.1）的发现在这里起到至关重要的作用。应用这种酶能够在体外（如在试管中）合成 mRNA 分子的互补 DNA 拷贝。这些 DNA 分子称为 **cDNA**，携带了 mRNA 分子在拼接去除所有内含子后所携带的所有序列信息。我们在本书中将提及基因组中基因的 DNA 克隆和 mRNA 转录物的 cDNA，由于篇幅的限制，我们将不对克隆过程进行详细叙述。

对于癌症研究者来说，基因克隆技术的出现恰到好处。正如我们将在下一章中看到的，20 世纪 70 年代的研究忽视了肿瘤病毒作为人类肿瘤病因的看法。当人们还没有开

始关注病毒时，细胞基因就被认为是导致人类肿瘤形成的最重要因素。如果没有新发展的基因克隆技术，对于这些基因的研究将是不可能实现的，这些技术在 20 世纪 70 年代后期开始被广泛应用以研究癌症的本质。

（黄常志　黄唯燕）

第2章　癌症的本质

在1902年发表关于双受精海胆卵发育研究的实验结果时，我提出了一个设想，恶性肿瘤有可能是源于细胞多级有丝分裂所导致的染色体的某种异常状态。因此，在很长的一段时间内，我都在为论证这个想法而进行大量的实验，虽然迄今为止仍未获得成功，但我从未怀疑该设想的正确性。

Theodor Boveri，病理学家，1914年

随着进化的进行，多细胞动物的细胞组成在解剖学设计水平上表现出巨大的多样性。而这些不同组织在设计上的可塑性，大部分都是由于构建组织和器官这座大楼的砖块——细胞，具有极大的自主性和多功能性。在多细胞动物中，绝大部分的细胞内都含有完整的生物体基因组，其所包含的信息量大大超过了任何一个细胞本身所需要的。在组织发育完全后，很多细胞仍然保持着生长和分化的能力。细胞增殖和参与**组织形态**发生的能力使成熟组织在整个生命过程中能具有自我维护的能力。这种维护作用包括对伤口的修复和替换因长期为机体服务而磨损老化的细胞。

同时，这种自主性和多功能性也会带来极大的危险，它们会让组织器官中的单个细胞获取到整个基因组的信息，而这些信息对细胞通常并非是全部公开的。此外，这些基因组序列常常会受到多种机制的破坏而发生结构的改变，进而改变其信息内容。这些突变基因可能使细胞获得全新的，且通常是异常的表型。这些改变通常与细胞正常功能不相容。

其中一些不适当的改变可能会变更细胞的生长周期，或者导致大量细胞不再遵循控制和维持正常组织结构的规则。

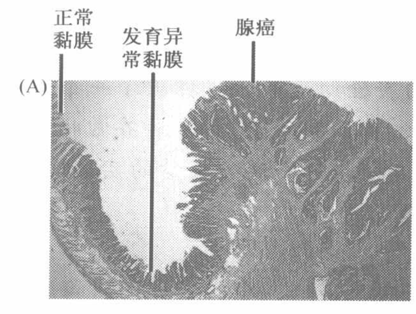
依据以上描述，肿瘤细胞的形成是脱离正常发育的结果。尽管机体有特殊的机制来防止这种情况的出现，肿瘤细胞还是找到了生存之道。正常细胞是严格按照设计好的程序去参与构建不同的组织从而使机体生存下来，而肿瘤细胞却有一种截然不同和更加集中的任务，它们好像是只考虑一件事情：尽可能的繁殖自我。

2.1　肿瘤起源于正常组织

19世纪中期和晚期的发现使我们了解到一个受精卵是如何发育成为组织和复杂器官的。这其中最重要的发现莫过于“所有组织都是由细胞及其产物组成”和“所有细胞都来源于原有细胞的分化”。将两者综合起来就能够得到下面的推论：复杂生命体的所有细胞都来源于特定的细胞系，而这些细胞系又能够追溯至受精卵。反过来说，就是受精卵能够通过反复的生长与分裂来产生生命体中的所有细胞。

这些认识对肿瘤起源的研究产生了深远的影响。早先，许多人认为肿瘤是一种通过某种方式植入患者体内的异己物，而现在，随着**组织病理学**的发展，肿瘤也如其他正常组织一样，能在显微镜下被研究者观察研究。通过对正常**组织切片**与肿瘤组织切片进行

对比观察发现，肿瘤组织也和其他正常组织一样，是由大量的细胞构成的（图 2.1）。



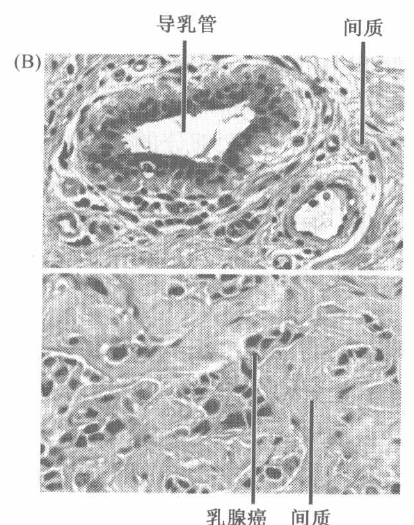


图 2.1　正常组织和肿瘤组织　(A) 低倍镜下的小肠回肠段上皮组织切片，反映了正常组织和癌组织之间的连续性变化。左边是正常上皮层，称为黏膜。中间是高度异常的黏膜组织，称为"异常发育上皮"，右边是完全的肿瘤组织——一个开始入侵其下层组织的腺癌。(B) 高倍镜下观察的一对来自于人乳腺的组织切片，显示出正常组织结构在肿瘤中如何变得混乱。在正常乳腺中（上图），导乳管由上皮细胞包围构成（核染成深紫色）。这些腺管被称为基质的间质组织包裹，而基质由结缔组织细胞（如成纤维细胞和脂肪细胞）与胶原蛋白构成（粉色）。在侵袭性的乳腺导管癌中（下图），构成腺管的正常上皮细胞转化成肿瘤细胞，这些肿瘤细胞具有异常的大细胞核（紫色），不再构成具有良好结构的腺管，且入侵到了基质（粉色）中。（A，from A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003；B，courtesy of A. Orimo.）

此外，大量事实表明，各种不同类型的肿瘤常常都是源于它们正常来源的自身组织，而不是外界的入侵体。然而，肿瘤确实有在体内迁徙的能力，在许多患者体内，癌细胞能在体内扩散并且形成新的癌细胞集落，因此多种肿瘤能在距其发源组织很远的地方被检测到（图 2.2）。这些新集落，即**转移灶**，通常都可被溯源到肿瘤发生的最初位点，即**原位癌**。

通常，对肿瘤组织细胞构成的详细探查表明，其组织结构的排列比周围正常组织要显得混乱无序（图 2.1）。这些组织病理学的比较结果为 21 世纪的研究提供了一个重要的以待证明的观点：肿瘤组织是由失去了聚集能力和构成正常组织能力的细胞构成的。简单地说，即恶性肿瘤可以看作是一类由细胞功能失常引发的疾病。

从逻辑上讲，所有肿瘤都应该能追溯到其发源的特定组织或器官，我们可以通过对肿瘤切片进行组织病理学分析来为此提供关键线索。这种简单的想法首次为肿瘤的分类提供了新方法——根据其推测的源发组织。这种分类就把发生于组织结构相同但功能不同的组织和器官的肿瘤划分为一个大类。

组织病理学使人们能够了解肿瘤的临床表现（如其对患者的整体影响）与其显微结构之间的关系。更重要的是，依据肿瘤侵略性生长的程度不同，我们将其划分为两个大类。那些只在某一处生长而不侵袭到邻近组织的被划分为**良性肿瘤**，而能够侵袭到邻近

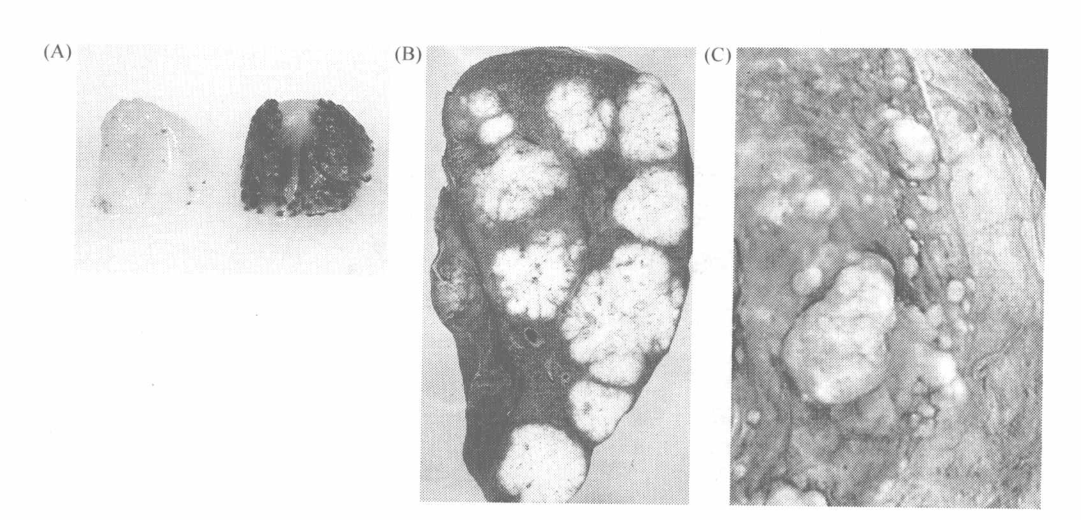


图 2.2　肿瘤的远处转移　很多种类的肿瘤最终都将释放出癌细胞，这些癌细胞迁移到身体较远的位点形成第二个肿瘤，也就是我们所认识的转移灶。(A) 转移灶可以很方便地在小鼠模型中进行研究，因为黑色素瘤细胞所产生的明显的黑色素沉积可以被精确定位。图示的是小鼠的肺脏，左图小鼠的黑色素瘤的转移几乎完全被抑制，而右图是尾静脉注射 B16 鼠黑色素瘤细胞两周后小鼠的肺脏，可见其表面已经布满了数百个转移灶（黑点部分）。(B) 晚期结肠癌患者常常发生肝转移（白色部分），将血液由结肠引流至肝的门静脉为结肠癌细胞的肝转移提供了直接通道。(C) 乳腺癌常常转移到脑部。图中，死者去掉硬脊膜覆盖的右脑中有巨大的转移瘤。(A，from F. Nimmerjahn et al. Immunity 23：41-51，2005；B，courtesy of Peter Isaacson；C，from A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003.）

组织和发生转移的称为**恶性肿瘤**。

事实上，除了少数由于扩张而压迫到重要组织器官的肿瘤块以外，绝大多数原发瘤是良性且对宿主无害的。

尽管如此，有些良性肿瘤也可能造成临床问题，因为它们会释放出高浓度的激素，从而导致机体生理的失衡。例如，**甲状腺瘤**（癌前上皮增生）能导致过量的甲状腺激素释放入循环系统，导致甲状腺功能亢进；而垂体腺瘤则能够导致过量生长激素的释放，导致某些组织的过度生长——一种称为**肢端肥大症**的情况。虽然如此，由良性肿瘤引起的死亡却很少见，绝大多数与肿瘤相关的死亡都是由于恶性肿瘤引起的。更具体的讲，其中有 90%的死亡是由于恶性肿瘤的转移灶所致。

2.2　肿瘤源于机体内许多特定种类的细胞

人类大多数肿瘤来源于上皮组织。**上皮细胞**是构成体腔、管道和表皮的线性排列的层状细胞，至于皮肤则是作为机体的外覆层。20 世纪头 10 年，详细的组织学分析显示具有上皮的正常组织则具有相同的结构，在上皮细胞层之下是**基底层**（有时也叫**基膜**）；基底层则把上皮细胞与下面的起支持连接作用的**间质层**细胞分开（图 2.3）。

基底膜是细胞外基质的一种特殊形式，主要是由上皮细胞分泌的蛋白构成。其他组

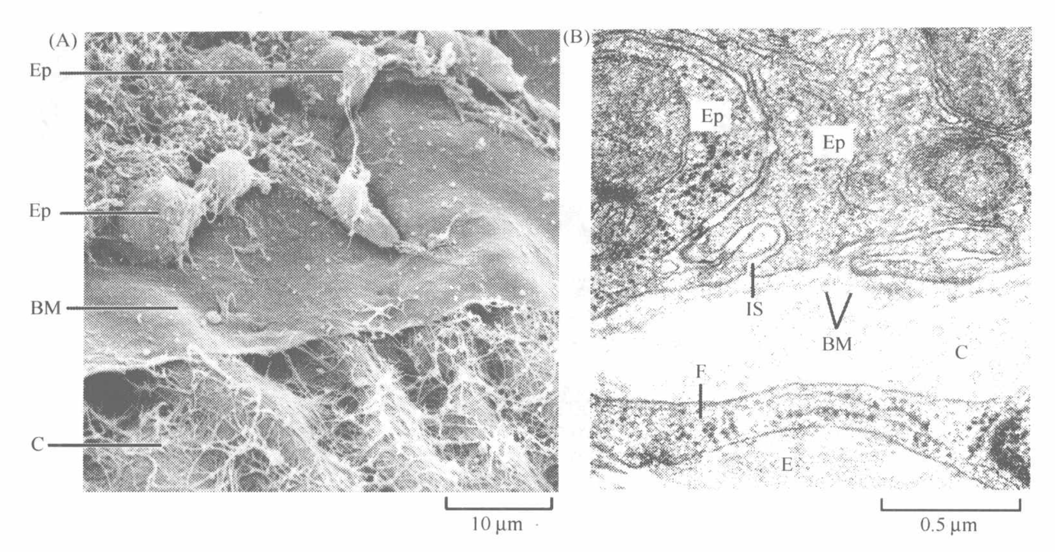


图 2.3　基底膜　（A）这是一张鸡角膜上皮电镜扫描图，显示了上皮组织的基本结构。图中，上皮细胞（Ep）附着于基底膜的一面。基底膜（BM）又称基膜，此处为一连续薄层状结构，通过基膜可以把胞外基质蛋白联系成一个网络。基膜下层是基质细胞和网络状的胶原纤维（C），胶原纤维把基质层的胞外基质（ECM）锚定到基底膜的内层。(B) 用高放大率的透射电镜观察小鼠气管上皮切片。图中基膜（BM）清晰可见，几个上皮细胞（Ep）在基膜之上，基膜之下是胶原纤维（C）、成纤维细胞（F）和弹性蛋白纤维（E）。请注意基膜并没有在细胞间隙处（IS）中断。（A，courtesy of Robert Trelstad；B，from B. Young et al.，Wheater's Functional Histology，4th ed. Edinburgh：Churchill Livingstone，2003.）

织的基底膜又有别的类型。例如，来自毛细管和较大血管内层的**内皮细胞**，就附着在一类特殊的基底膜上，并通过此基底膜与外层特殊的平滑肌细胞分开。总体来说，这些基底膜都是作为组织的脚手架结构。另外，在后面将会提到，细胞能够使多种有生物学活性的信号分子附着于基底膜。

为什么我们对上皮细胞如此感兴趣呢，因为它孵育产生人类最常见的肿瘤，称之为**癌**。在西方有 80%以上的癌症相关的死亡是这类肿瘤引起的。其中包括胃肠道上皮细胞层来源的肿瘤，胃肠道又包含口腔、食管、胃、小肠和大肠，以及皮肤、乳腺、胰腺、肺、肝、卵巢、胆囊和膀胱来源的肿瘤。正常上皮组织例子见图 2.4。

这类组织所包含的细胞是由脊椎动物早期胚胎的全部三个胚层发育而来的。其中，肺、肝、胆囊、胰、食道、胃和肠的上皮组织都由**内胚层**发育而来。皮肤是来源于**外胚层**，而卵巢是来源于**中胚层**（图 2.5）。由此可见，癌症的组织病理学分类并不是依据源发组织的发育史划分的。

各个组织的上皮和基质细胞共同作用形成和维持了其表皮层。从进化的角度来看，组织和构建上皮组织的胚胎学机制似乎在 6 亿年前多细胞动物进化的早期就形成了，这些机制在多细胞动物的进化过程中屡次发挥作用，建立起了具有多种生理功能的各种组织和器官。

绝大多数恶性肿瘤可被分为两类，分别反映出与上皮细胞相关的两个重要的生物学功能（表 2.1）。一些上皮细胞层的主要作用是封闭腔穴或管道的表面并且保护其下层

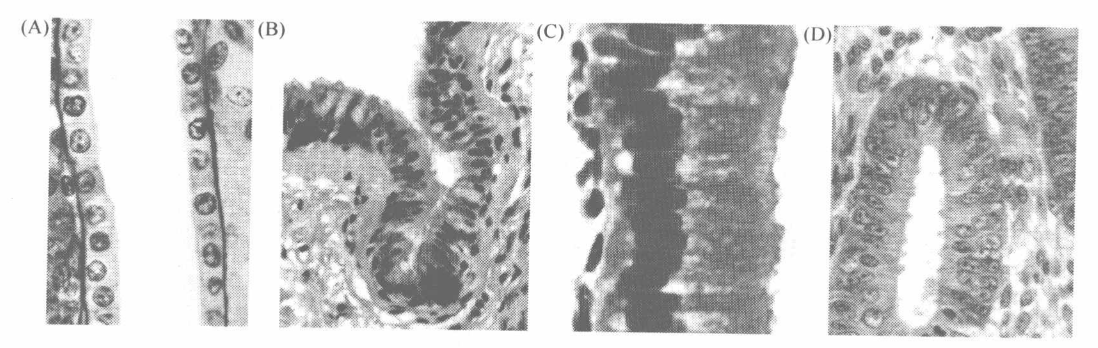


图 2.4　上皮组织的结构　绝大多数上皮组织的结构：成熟的、已分化的上皮细胞位于组织的最表层。在很多组织中，位于这层细胞之下的是次分化的上皮细胞，图中未示出。基底膜（图 2.3）位于上皮细胞层之下，通常在光镜下不可见。图中依次是（A）肾收集管、（B）肺小支气管、（C）胆囊柱状上皮、（D）子宫内膜的上皮组织。这些上皮细胞的主要作用就是保护其内侧的组织，使其不与上皮细胞组成的管腔中的内含物接触。（From B. Young et al.，Wheater's Functional Histology，4th ed. Edinburgh：Churchill Livingstone，2003.）

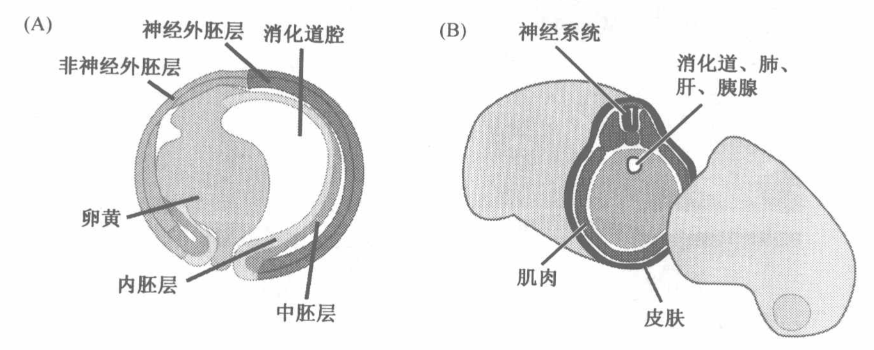


图 2.5　胚层图　（A）多细胞动物复杂的组织都是由三个胚层发育而来的——外胚层（蓝）、中胚层（绿）、内胚层（黄），每一个胚层都分化发育为各种不同的细胞。（B）在蝌蚪的幼年时期，皮肤和神经系统由外胚层（灰色、黑色）发育而成，而一些连接组织，如骨骼、肌肉和造血细胞则是来源于内胚层（红色）、消化系统及其衍生物，如肺、胰腺和肝等是由内胚层（白色）发育而来。所有脊椎动物的发育都是按此而来。（Adapted from T. Mohun et al.，Cell 22：9-15，1980.）

的细胞（图 2.6）。由构成这些保护性细胞层的上皮细胞发展而来的肿瘤叫做**鳞状细胞癌**，如皮肤和食道的上皮细胞就能够衍生出此类肿瘤。

表 2.1　各种癌

常见腺癌的组织位点	常见鳞状细胞癌的组织位点	其他癌
肺	皮肤	小细胞肺癌
肠	鼻腔	大细胞肺癌
乳腺	口咽	肝细胞癌
胰腺	喉	肾细胞癌
胃	肺	移行细胞癌（膀胱）
食管	食管	
前列腺	宫颈	
子宫内膜		

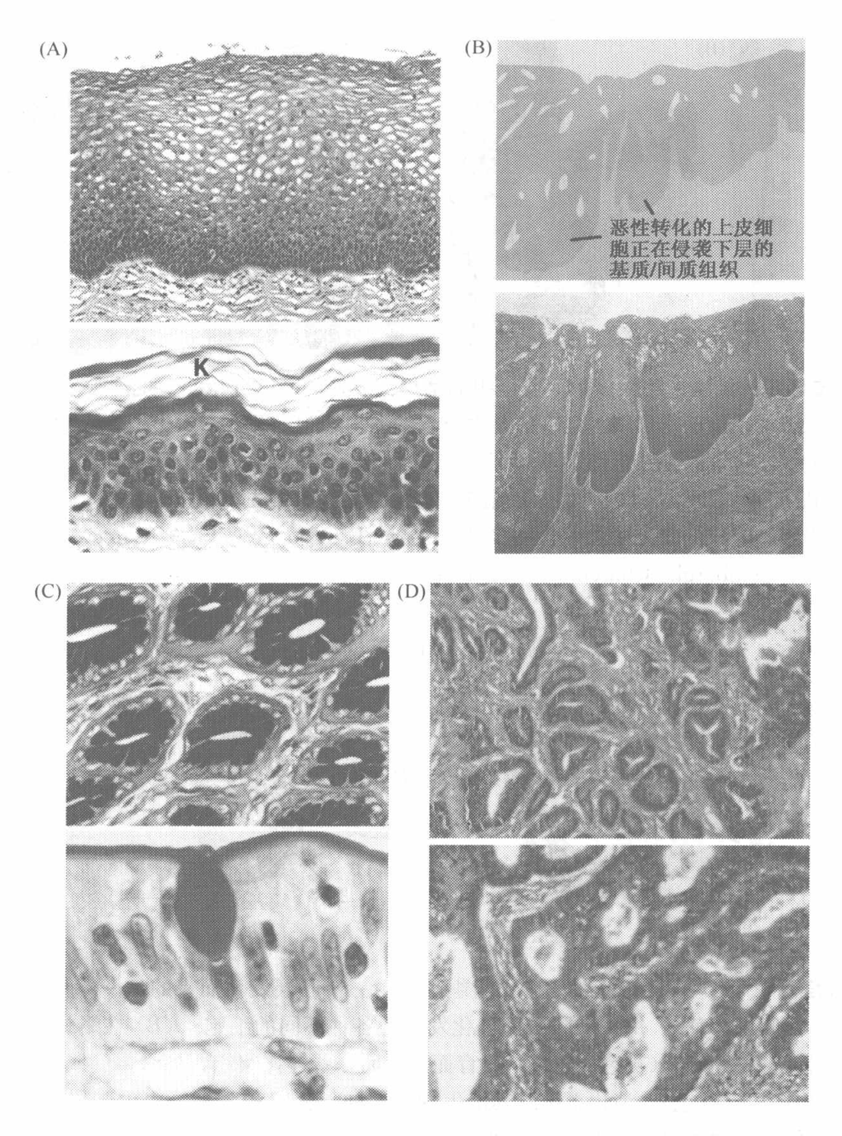


图 2.6　上皮细胞及其衍生癌　根据正常上皮细胞的形态和功能及其衍生的癌可以将上皮划分为几个亚型。本图展示了鳞癌和腺癌的发生。(A) 正常的鳞状上皮细胞呈扁平状，其作用是保护上皮细胞及其下面的组织不受管腔内物质的作用，至于皮肤，则是保护其不受外界有害物质的作用。子宫颈的鳞状上皮细胞（上）与皮肤（下）上皮细胞的组织排列十分相似，成熟的扁平细胞在最外层，不断脱落（如皮肤的角质化细胞），取而代之的是下层的次成熟细胞。(B) 在食管癌中，恶性转化的上皮细胞正在侵袭下层的基质/间质组织。(C) 在某些组织中，上皮中的腺细胞通过分泌黏多糖来实现保护作用，另一些组织中，它们分泌的蛋白质在管腔中起作用或者分布于身体中较远的位点。胃壁上的小凹孔就是由黏液分泌细胞排列而成（深红色，上图），在小肠上皮组织中（下图），单个的杯状黏液分泌细胞（紫色）被柱状上皮细胞所包围，其作用是吸收水分。(D) 这些来自胃（上图）和结肠（下图）的腺癌都表现出了腺管的特征，从这些特征我们可以清楚地看到，它们是从一些像图 C 所示的分泌型上皮细胞中衍生而来的。(A and C, from B. Young et al., Wheater's Functional Histology, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003; B and D, from A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

还有许多上皮组织中存在特殊的具有分泌能力的细胞，它们可以释放分泌物到自身形成的导管或腔穴中。这种上皮组织衍生的癌称为**腺癌**。这些分泌物的作用通常是保护上皮细胞层不受腔穴内物质的作用（图 2.6）。肺和胃的上皮细胞所分泌的黏膜层就分别保护其不受空气（及空气颗粒物）和胃酸的腐蚀作用。在某些器官如肺、子宫、子宫颈中，上皮细胞层能够发展为纯粹的腺癌或鳞状上皮癌；而在更多的情况下，两种类型的癌细胞共存于这些器官的肿瘤中。

其余的恶性肿瘤是来源于机体的非上皮组织。非上皮组织来源的癌症中，第一大类来源于机体的各种连接组织，它们都是来源于胚胎的中胚层（表 2.2）。这一类称作**肉瘤**的肿瘤，只占临床肿瘤的 1%。来源于多种**间质细胞**。包括分泌胶原的**成纤维细胞**及其相关结缔组织细胞，它们是肌腱和皮肤的胞外基质的主要构成组分；**脂肪细胞**，它们在胞质中储藏脂肪；**成骨细胞**，在胶原基质中聚集磷酸盐结晶以形成骨骼；还有组成肌肉的**肌细胞**（图 2.7）。另一种相对罕见的**血管肉瘤**，是源于血管内皮细胞的前体细胞，在其内皮组织的基质层中包含了多种间质细胞。

另一大类非上皮组织来源的恶性肿瘤是由各种构成**造血系统**的细胞转化而来，包括免疫系统的细胞（表 2.3 和图 2.8）。**血红细胞**、能分泌抗体的**浆细胞**、T **淋巴细胞**和 B 淋巴细胞均属此类。白血病就是由一些造血细胞系发生恶性转化而致，它们不同于血红细胞，胞内没有细胞色素，而且能够自由的穿行于循环系统中。白血病中的肿瘤细胞是呈单细胞群落，散布在循环系统中的，而淋巴系（T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞）肿瘤则能够聚集在淋巴结形成实体瘤。

第三大类也是最后一类非上皮组织来源的肿瘤，是由构成中枢和外周神经系统的各种细胞恶性转化而致（表 2.4）。这类肿瘤通常被称为**原始神经外胚层瘤**，反映了其是从早期胚胎的外胚层发育而来，包括**神经胶质瘤**、**胶质母细胞瘤**、**成神经细胞瘤**、**神经鞘瘤**和**髓母细胞瘤**（图 2.9）。此类瘤只占已发现的恶性肿瘤的 1.3%，在肿瘤相关的死亡中，有 2.5%由该类型肿瘤造成。

表 2.2　数种常见肉瘤

骨肉瘤
脂肉瘤
平滑肌肉瘤
横纹肌肉瘤
恶性纤维组织细胞瘤
纤维肉瘤
滑膜肉瘤
血管肉瘤
软骨肉瘤

表 2.3　各种类型的血液系统恶性肿瘤

急性淋巴细胞性白血病
急性骨髓性白血病
慢性髓细胞性白血病
慢性淋巴细胞性白血病
多发性骨髓瘤
非 Hodgkin 淋巴瘤
Hodgkin 氏症

注：非 Hodgkin 淋巴瘤，也称淋巴细胞淋巴瘤，可以不同的分类标准分成 15～20 个区别明显的小类。

表 2.4　各种神经外胚层恶性肿瘤

多形性成胶质细胞瘤
星形细胞瘤
硬脑（脊）膜肉瘤
神经细胞瘤
眼癌
成神经细胞瘤
室管膜瘤
少突胶质细胞瘤
成神经管细胞瘤

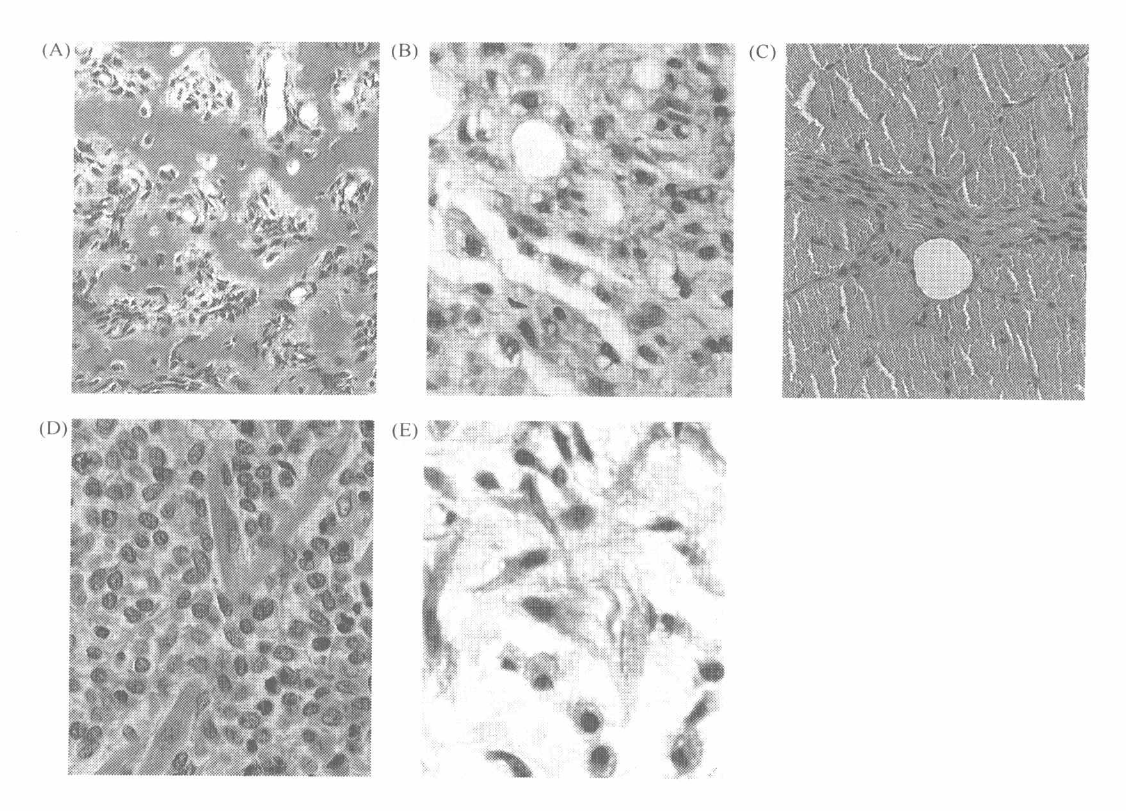


图 2.7 间质细胞瘤 (A) 此图为骨肉瘤，可见恶性转化的成骨细胞（核染呈深紫色），它们与其周围的胞外基质构成了矿化骨骼（粉色）。(B) 脂肪细胞的作用是在各种组织中储存脂肪小体，而脂肪瘤就是由此细胞转化而来。图中的脂肪瘤细胞由于脂肪小体的存在而呈现泡沫状。(C) 平滑肌肉瘤（中央部分，核染呈深紫色）是由平滑肌（浅紫色）中的细胞转化而来，被平滑肌纤维（浅紫色）分割成个别的小肿瘤细胞群生长。(D) 横纹肌肉瘤是由横纹肌中的细胞转化而来；此处的癌细胞（核染呈暗红色）被许多正常肌细胞（红色）包围。(E) 这是一种特殊的肉瘤，来自解剖学上很特殊的位置——脑脊膜，脑脊膜的作用是形成脑的保护层。(A to D, from A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003; E, from B. Young et al., Wheater's Functional Histology, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.)

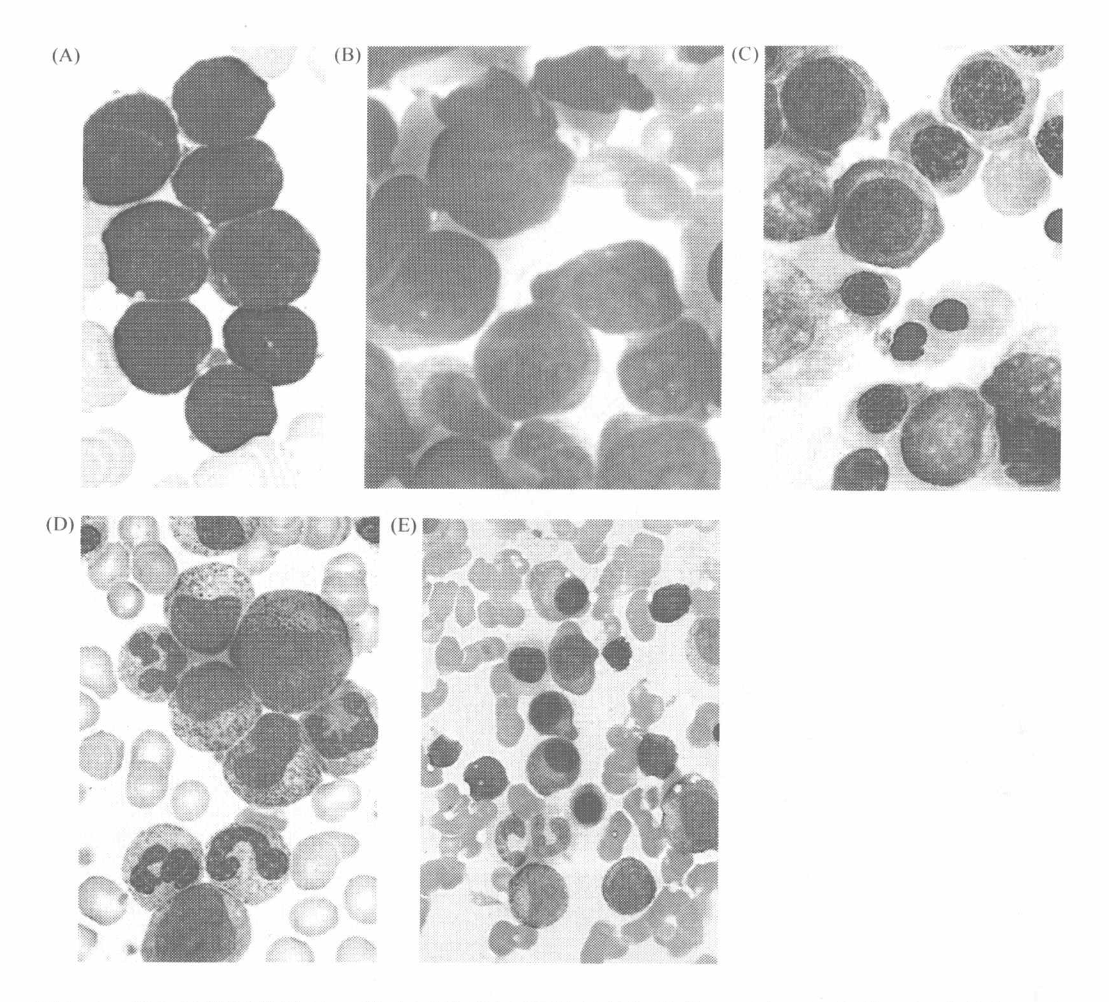


图 2.8 造血系统恶性肿瘤 造血系统恶性肿瘤有多种类型。（A）急性淋巴细胞性白血病（ALL），来源于 B 淋巴细胞系（80%）和 T 淋巴细胞系（20%）（见 15.1 节）。此肿瘤的特殊抗原标志表明它是来源于前 B 细胞的。（B）急性骨髓性白血病（AML）细胞，与大多数造血系统恶性肿瘤一样，在其巨大的细胞核外仅有少量的细胞质。它们是由形成各种粒细胞和单核细胞的前体细胞转化而来，单核细胞后来发育成巨噬细胞。（C）红白血病，其中的成红细胞与已分化的红细胞的前体细胞极为相似。（D）在慢性骨髓性粒细胞性白血病中，出现了一系列自骨髓细胞系中分化而来的白血病细胞，说明在此病中，骨髓干细胞分化成多种不同的细胞。（E）多发性骨髓瘤（MM）是由于 B 淋巴细胞系中的浆细胞恶性转化所致，而浆细胞的功能是产生和分泌抗体分子，所以其形态上具有较大的胞浆区。此图展现了在多发性骨髓瘤中处于不同分化时期的浆细胞（核染呈紫色）。所有的显微图片中，背景上众多轻微着色的是血红细胞。（From A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003.）

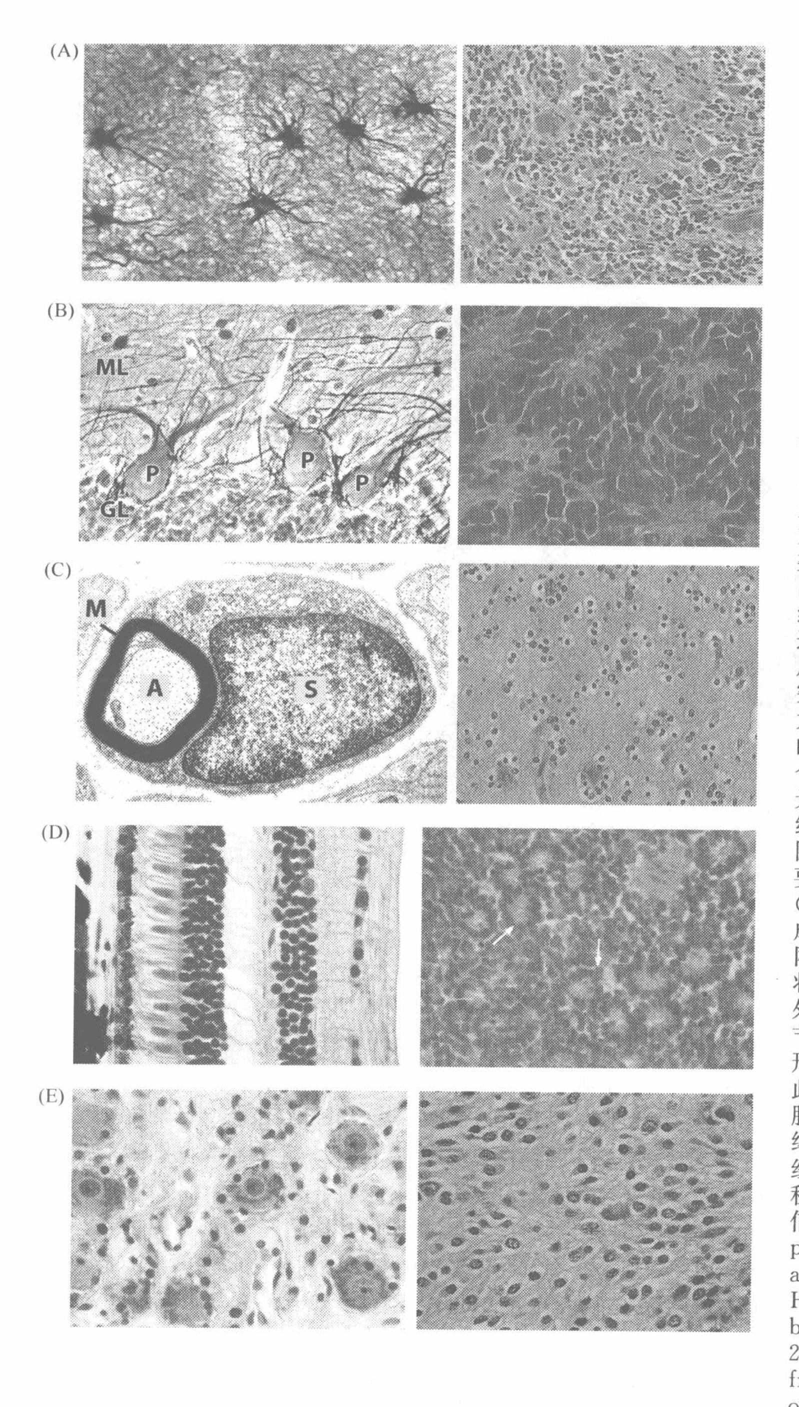


图 2.9 神经外胚层肿瘤 在中枢和外周神经系统的多种细胞组分都能发生恶性转化， （A）星形胶质细胞——一种非神经细胞，作为脑的支持细胞（左图，深紫色），可能是星形细胞瘤和胶质母细胞瘤（右图）的前体细胞。多形性胶质母细胞瘤是根据构成肿瘤的众多不同神经外胚层细胞类型命名的。这些肿瘤细胞具有大小不一的细胞核（紫色）。（B）小脑的颗粒层细胞（GL）（左图）处于皮质区的浦肯野细胞（P）层和分子层（ML）之下。右图是能形成髓母细胞瘤的颗粒细胞的前体细胞，它能分化发育成神经元、神经胶质细胞和色素神经上皮细胞（核染呈紫色，胞浆染呈粉色）。如图中所示，约有 1/3 的此类肿瘤细胞呈花环状。（C）图示为一个施旺（Schwann）细胞（S，左图），这类细胞通常包裹在轴突（A）外形成髓鞘层（M），并帮助轴突进行神经电传导。该细胞为少突神经胶质瘤（右图）的前体。此肿瘤的特征是每个赘生细胞的细胞核被一圈光晕包围。（D）视锥、视杆细胞和其他神经细胞（左图）是构成正常视网膜的重要组分，视网膜母细胞瘤（右图）就是来源于这些形成视网膜细胞的母细胞。视网膜母细胞瘤通常呈花环状，图中用箭头示出。（E）外周神经系统中的交感神经节细胞（左图中较大者）易形成神经母细胞瘤（右图），此肿瘤多发于儿童。单个的肿瘤细胞由高密度的纤维网络包围，这种纤维网络在神经元轴突——树突的形成过程中起到与其他神经元交换信息的作用。（A to E left panels, from B. Young et al., Wheater's Functional Histology, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003; A to E right panels, from A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.）

2.3 一些不属于以上分类的肿瘤

不是所有的肿瘤都可以很切合的划分到以上四大类肿瘤中。例如，**黑色素瘤**是来源于皮肤和视网膜中内含色素的黑色素细胞，而黑色素细胞则是由胚胎中的**神经脊**发育而来。尽管与神经外胚层细胞的发源地如此接近，但随着发育的进行，它却如一个流浪者般最终落脚于皮肤和眼睛的组织中，为它们提供色素，与神经系统没有任何直接联系（图 2.10）。

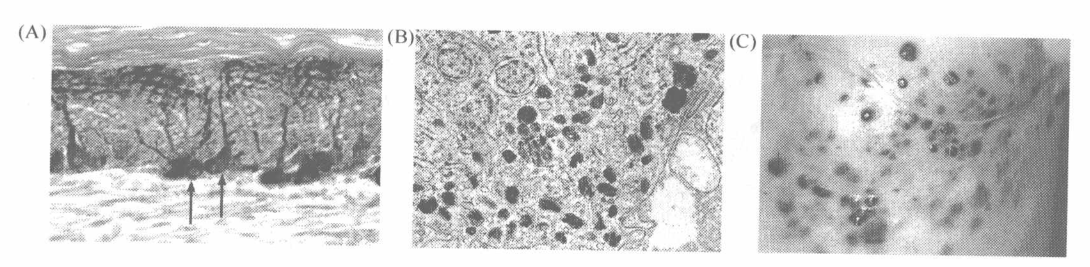


图 2.10 黑色素细胞与黑色素瘤 （A）黑色素细胞（箭头示处）通常分散于皮肤的基底角化细胞间（同见于图 2.6A），能够形成色素颗粒。它们具有长而细的指状胞质突，用以将色素颗粒储存于角质化细胞的胞浆中，而角质化细胞是上皮的主要组成部分。皮肤表面的死亡的角化细胞层（上层）和基质细胞（下层）也同样清晰可见。（B）此图中于电镜下可见的色素颗粒使黑色素瘤受到研究者的偏爱，因为它们形成的转移灶（见图 2.2A）能够被迅速检测到。一旦黑色素瘤直接从皮肤表面层侵入到了下层的基质内，它们就很可能转移到远处组织中。（C）该案例向我们很好地展示了这种疾病转移的性质和能够被迅速检测到着色的转移灶。（A，from W. J. Bacha Jr. et al.，Color Atlas of Veterinary Histology，2nd ed. Philadelphia：Lippincott，Williams and Wilkins，2000；B and C，from A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003.）

在**小细胞肺癌**（SCLCs）中有许多具有**神经分泌细胞**特征的细胞，就像**肾上腺**中的某些神经脊来源的细胞一样，具有分泌功能。这类细胞通常能对神经信号做出反应，分泌具有生物活性的肽类。在肺的发育过程中，某些神经外胚层细胞会缓慢地嵌入肺中并与其共同生长发育，迄今还未确定这种多发于吸烟者的小细胞肺癌是否由这些神经外胚层细胞发生癌变引起。而另一种看法认为，这些源于肺部内胚层细胞集落的肿瘤，失去了一些本身的上皮细胞特征，同时又呈现出了一些神经外胚层细胞系的特征。

这种组织系的转换和随之而获得的一套全新的已分化成熟的特性通常被称作**转分化**作用。发生**转分化**作用的细胞在胚胎发生期就转变成了另一种组织细胞，而且这种细胞系的转变并不是不可逆的，在特定的情况下，细胞能从一种分化成熟的细胞系转化成另一种细胞系。这种转分化作用不仅能影响到正常细胞，对肿瘤细胞也能产生作用。例如，在很多恶性肿瘤的边缘，上皮组织来源的肿瘤细胞自身形态和基因表达程序能发生转变，从而获得其周围的间叶组织来源的基质细胞的特征。这种细胞表型的显著改变叫做**上皮间叶细胞样转变**（EMT），说明了这种通常只表现上皮样特征的细胞具有极大的可塑性。正如后面的章节要提到的（第 13 章、14 章），这种转变常常赋予了恶性肿瘤细胞侵袭到邻近正常组织的能力。

尽管我们知道了存在这些例外，但大多数肿瘤还是受到一个共同的生物学原理控制的。虽然肿瘤细胞已与其发源的正常细胞在行为上有很大的区别，它们仍保留了一些正常组织细胞的显著特征。这些特征为我们研究肿瘤的起源提供了重要的线索，病理学家能依据这些特征进行肿瘤活检，并判断出肿瘤起源于哪个组织，进而进行分类，这种判断甚至不需要知道活检的肿瘤组织是从解剖学上的哪个部分取出的。

在少数情况下（1%～2%），病理学家会发现某些肿瘤已经完全丧失了针对其来源的组织特异性和分化特征。这叫肿瘤的**去分化**作用，针对这种进行**退行性**发育的肿瘤，病理学上用于判断肿瘤发源的标准就不再适用了（图 2.11）。

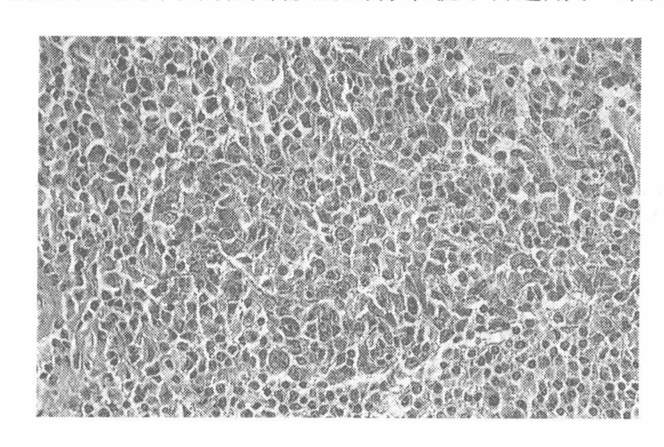


图 2.11 来源不明的退行性发育肿瘤 此图为一退行性发育肿瘤的组织切片，正如图中所示，很难判断此肿瘤起源于哪种组织。用针对组织特异蛋白的抗体来进行染色也不能提供可靠的信息进行判断。(From A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

2.4 肿瘤是多阶段逐步发展形成的

在正常组织和高度恶化的肿瘤组织两个极端之间，机体组织形态还存在着丰富的中间过渡状态。这些处于不同恶化阶段的细胞，反映了细胞逐步从正常组织过渡到越来越具有侵袭和转移能力的恶化状态的过程。因此，肿瘤的每一个表型都代表了肿瘤发生发展过程中的一个阶段。如果真是这样，从这些不同的组织形态我们就可以得知，肿瘤的发生发展是一个多阶段的十分复杂的过程，关于这一点我们将会在第 11 章详述。

还有一些特殊的细胞肿块，它们与正常组织差别不大，但是在细胞数量上却异常增多。这种肿块叫做**增生**（图 2.12）。虽然形成增生组织的细胞的增殖明显不受控制，但其聚集成为组织的能力与正常细胞别无二致。

另一种同样与正常组织差异不大的现象称为组织转化，也称**化生**。在这种组织中一种正常的细胞层被另一种的细胞取代，后者通常不会出现在此正常组织中。而这些入侵者虽然处于错误的位置，但在镜检下却往往表现得完全正常。化生常常发生在上皮组织的过渡带中，该处是不同类型上皮细胞的交汇处。这种过渡带多见于子宫与子宫颈以及食管与胃的连接处。

在上述两个连接处，扁平上皮细胞往往会急剧地转变成分泌黏液型上皮细胞。例如，食管癌变前的一个早期指征就是一种称为**巴氏食管**（Barrett's esophagus）的化生情况，食管中的扁平上皮细胞会被一种常见于胃部的分泌型上皮细胞取代（图 2.13）。尽管这些胃细胞具有非常正常的外观，但这种化生通常被认为是食管癌的早期步骤。实际上，巴氏食管症患者发展成为食管癌的风险比正常人高 30 倍。

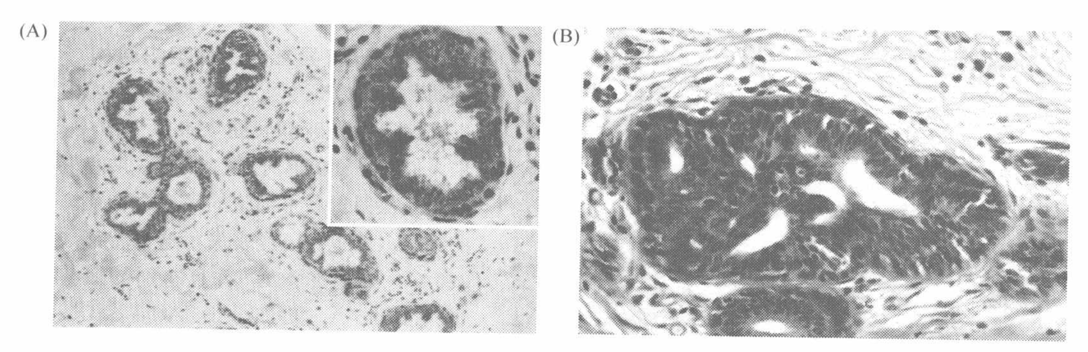
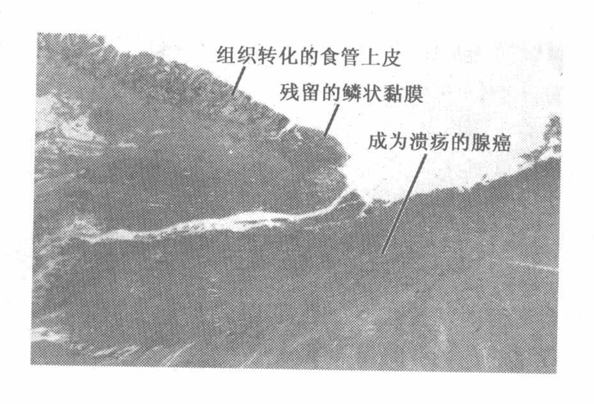


图 2.12　正常和增生的上皮组织　正常乳腺导管上皮组织与其不同程度增生组织的比较（A）从图中低倍和高倍（内图）的组织切片可以看出，在轻度增生的乳腺导管中，腺管上皮细胞开始聚集并且向管腔内突出生长。（B）在进一步增生的乳腺导管中，上皮细胞聚集在一起几乎完全充盈于整个腺管。但它们却不渗透到基底膜（图中未示出），也不侵袭到下面的基质中。（From A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003.）

图 2.13　上皮细胞的化生转变　在某些癌变前状态，正常存在的上皮细胞会被其邻近组织的上皮细胞取代，这个过程就叫化生。例如，在巴氏食管（或称巴氏食管炎）中，原来构成食管鳞状黏膜壁的扁平细胞，被来自胃壁内层的分泌型细胞所取代（巴氏食管化生）。这种化生一般是由长期性的胃酸回流所致，而且容易导致食管癌的发生。这种食管癌发展于食管，却来源于胃部细胞（溃疡性腺癌）。（Adapted from A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003.）



发育异常是一种更加异常的组织状况。这类细胞在**细胞学**上的表现非常不正常，其改变包括细胞核大小和形状改变，细胞核染色加深，核质比例增大，核分裂能力增强以及与组织中正常分化细胞相关的胞质特征丢失（图 2.14）。在发育异常的组织中，原见于正常组织的不同类型细胞的相对数值都发生了改变。总的来说，由于单个细胞和细胞数量的重大变化使整个组织形态结构发生了改变。发育异常是由完全良性肿瘤至癌变前的过渡状态。

在上皮组织中表现更加异常的是腺瘤、息肉、腺瘤性息肉、乳头状瘤，而位于皮肤中的称为疣（图 2.15）。它们通常形成大块的集落以致肉眼可见，包含了正常上皮组织细胞的所有类型，但这些细胞大量的向外扩张，形成肉眼可见的块状物。在显微镜下观察，腺瘤中的组织是发育异常的，它们通常长到一定大小便停止生长，并且绝不穿过基底膜，所以与基底膜下方的上皮组织仍然是隔开的。正是由于这一点，一般认为它们是良性的。

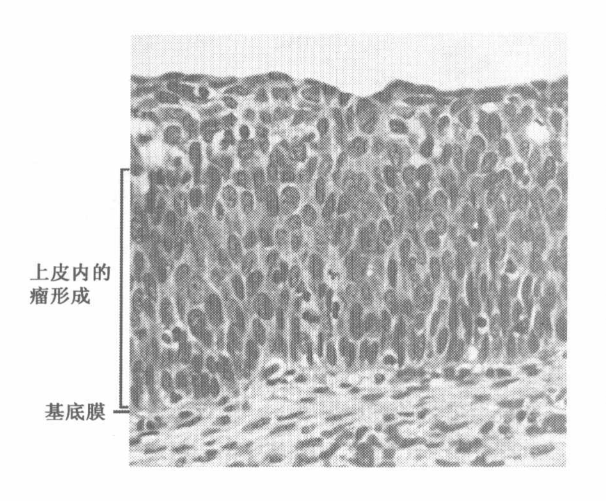
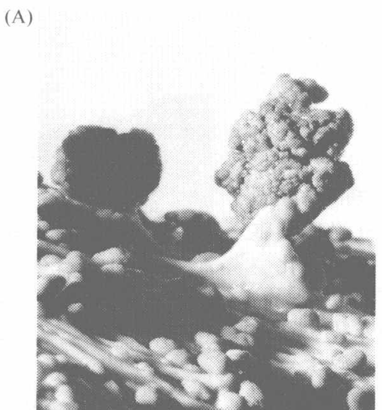
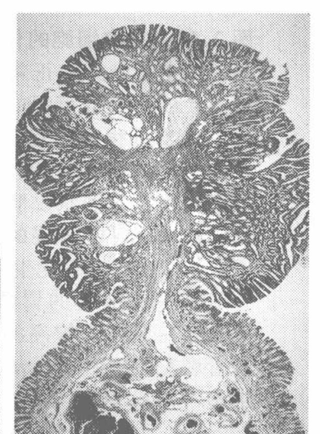


图 2.14 发育异常的上皮组织结构 在此处的晚期子宫颈上皮内鳞状瘤样病变中，上皮细胞还未突破基底膜（未摄于图中），也未入侵到下面的基质层。然而，只有最上层细胞还保留着扁平细胞的平扁样特征。下层的细胞（紫色）已经丧失了这种特征（见图 2.6A），细胞核增大，并且在别的细胞层聚集。(From A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

(A)





(B)

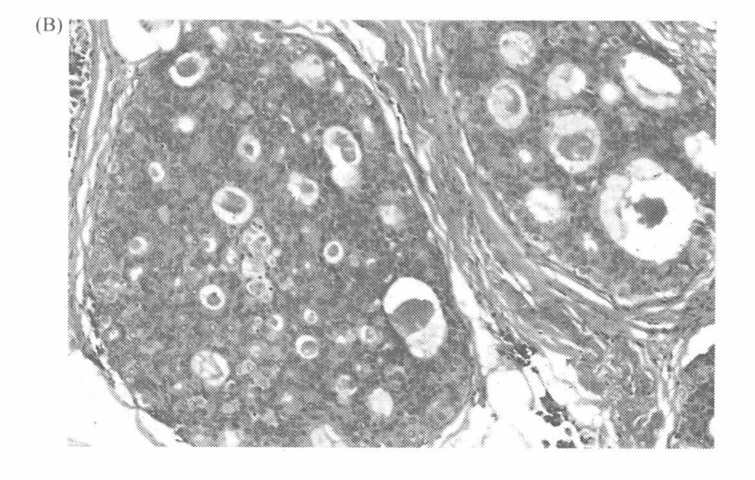


图 2.15 侵袭前的腺瘤和恶性肿瘤 腺瘤，在某些器官中被称为息肉，具有与正常组织和发育异常组织显著不同的形态学特征。(A) 在结肠中，侵袭前肿块的形态既有如扁平肥厚型结肠壁（座生型息肉，未示出），也有图中展示的柄状肿块（有蒂息肉）。这些肿块也叫腺瘤，并不渗透到基底膜，也不侵袭到下面的基质层。左图是息肉普通照片，右图是其显微切片照。(B) 在此处的乳腺内导管癌中，上皮癌细胞几乎完全充盈于两个导管（左、右图）且将其撑得很大，但它们也没有突破基底膜，侵袭到下面的基质层。(A, left, courtesy of John Northover and Cancer Research, UK; right, courtesy of Anne Campbell; B, from A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

更进一步的异常状态是侵袭到其下层组织的肿块（图 2.16）。在这里，我们第一次面对能夺走患者生命的恶性肿瘤。临床肿瘤学家和外科医生通常用“癌”来代表这种肿块或比其更严重的情况。在本书中，与同时期很多肿瘤研究出版物一样，“癌”被用来泛指各种类型的异常肿块（在上皮组织中，癌指具有侵袭能力的肿块）。这些良性的或者恶性的肿块，都被统称为**瘤**，表示是一种新的组织类型（有些研究者把瘤专指恶性肿瘤）。

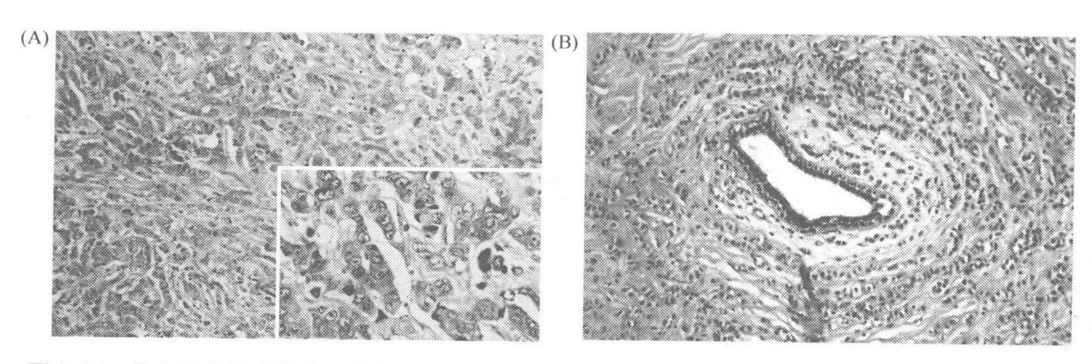


图 2.16 具有侵袭能力的癌 肿瘤只有在其突破基底膜进而侵袭到附近的基质层时才被视为恶性的。(A) 在这个浸润性的乳腺导管癌中，像小岛般的上皮肿瘤细胞混杂于基质细胞中。插图是局部放大图，可见癌细胞与内腔共同构成退化的导管。(B) 在侵袭性乳腺小叶癌中，癌细胞以单个的形式入侵到了基质层，并分散于其中（大量的核染紫色细胞）。这些上皮癌细胞包围在同一个导管周围——原位癌，并向导管内腔方向生长，还未突破基底膜入侵到基质中。(From A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

正如前面所提到的，处于源发性肿瘤的细胞能通过循环系统转移到机体远处而形成新的癌细胞克隆。这个过程非常复杂，需要癌细胞侵袭到邻近的组织中，进入血管和淋巴管，通过这些管道迁徙到身体远端，并再次突破血管或淋巴管，侵入下层组织，在此处形成新的癌细胞克隆。这些步骤将会在第 14 章详细讨论。

这里划分的各种肿瘤代表了不断加剧的组织异常程度，它们似乎是进行性**肿瘤发生发展**过程中的停顿点，在该过程中正常组织逐渐发展为高度恶化的癌组织。然而，以上描述仅仅暗示出不同肿瘤之间这种前体-产物的关系（如正常组织→增生组织→发育异常→成瘤→迁徙转移），而绝对不是证明。

2.5 肿瘤是由单克隆发育而来

即使我们接受了肿瘤是从正常细胞逐步转化而来的概念，另外一个问题却依然未被解决，即多少正常细胞是肿瘤细胞的祖先（图 2.17）？肿瘤是由单个的细胞跨越了从正常到异常的界限发育而来的呢？还是有一大群细胞历经这种改变，每一个都变成了一个肿瘤块中单个亚群细胞的祖先呢？

对这个问题最有力的回答就是确定肿瘤块中是否所有细胞都具有一种共同的、高度特异性的遗传学或生物化学标记。例如，随机的体细胞突变可以视为细胞的独特标记，如果这种标记出现在肿块中所有的细胞里，就可以说此肿瘤块中所有细胞都是起源于同

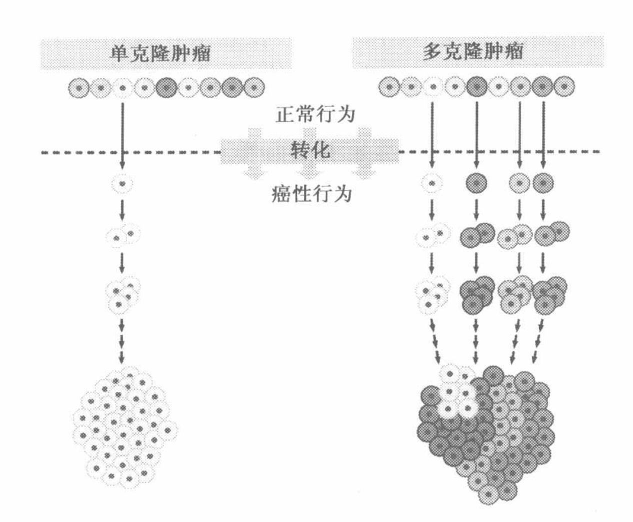


图 2.17　肿瘤的单克隆性和多克隆性　理论上，肿瘤可以起源于单克隆，或者多克隆。在多克隆肿瘤（右图）中，多种细胞跨越了正常到恶性转化细胞的界限，从而变成了一个肿瘤块中多种遗传学上有显著区别的细胞亚群各自的祖先。在单克隆肿瘤（左图）中，只有单个细胞从正常状态转变成具有癌性行为的状态，从而变成了一个肿瘤块中所有细胞的祖先。

一个突变的细胞，并且都从这个共同的祖先那里继承了这种突变标记。这种起源于单个祖先的细胞集落，就称为是**单克隆**性的。同样地，如果肿块是由一系列具有不同遗传学特征的细胞亚群构成的，而这些细胞之间并不存在共同的祖先，那么该肿块就被称为是**多克隆**性的。

确定肿瘤细胞群体克隆性的第一个实验，实际上是依赖于自然发生的、**后生**的标记物。如前所述（见信息栏 1.2，图 1.10），在雌性哺乳动物早期胚胎的体细胞中，每个细胞内的两条 X 染色体会随机的发生失活现象，只保留其中一条。这种失活事件的发生，使失活染色体上的几乎全部基因的转录都被抑制，而且其核型的改变也证明了失活的发生，失活的那条 X 染色体凝集浓缩，形成称为巴氏小体的细小颗粒。一旦胚胎细胞中发生了某条 X 染色体的失活（来自于母方或者父方），由这个胚胎细胞发育而来的全部成熟组织细胞都与其祖先保持一致，细胞中相同的 X 染色体均失活。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）的基因就在 X 染色体上，超过 30％美国黑人女性在此位点上呈现杂合状态。也就是说，两个等位基因能编码该酶的两种不同形式，并能够通过淀粉凝胶电泳或者根据其中一种形式具有对热处理更敏感的性质能将其区分开。由于 X 染色体失活，这些杂合体女性的每一个细胞都只表达两个 G6PD 等位基因的其中一条，从而在胞内合成不同的 G6PD 蛋白（图 2.18）。在杂合个体的大多数组织里，约有半数的细胞合成其中一种形式的酶，另一半细胞合成另一种。1965 年报道了非裔美国人杂合体中发生的**平滑肌瘤**（位于子宫壁的良性肿瘤），每一个平滑肌瘤总是只表达 G6PD 酶两种可变形式中的其中一种。这说明很有可能此肿瘤所有细胞都是来源于一个共同的祖细胞，只表达一种固定的等位基因。

这个关于肿瘤是源自单克隆的概念随后又得到了多次证明。其中一个证据来自于对**骨髓瘤**的研究，骨髓瘤主要是源自能分泌抗体的浆细胞的母细胞——B 淋巴细胞。通常情况下，B 淋巴细胞库是由数量极多的、区别明显的亚群构成，经过**免疫球蛋白**基因的重排作用，每一个亚群细胞都分泌一种特异性的抗体。与之不同的是，骨髓瘤患者的浆细胞却产生相同的抗体，提示它们是从之前的复杂异质群体细胞中的某一单个细胞发育而来的，具有共同的祖细胞（图 2.19A）。

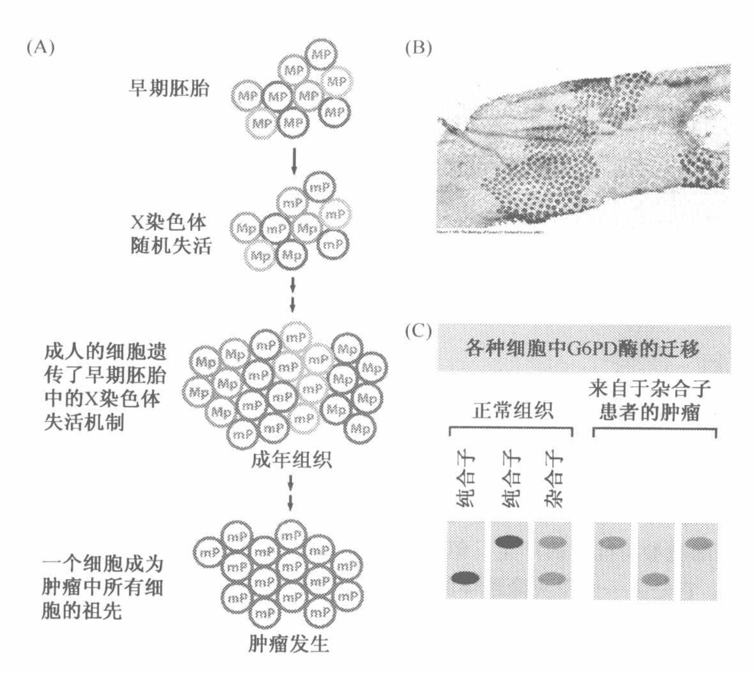


图 2.18　X 染色体失活模式和肿瘤的单克隆性　(A) 在雌性胚胎的早期，分别来自父方（P）和母方（M）的两条 X 染色体都处于相同的活化状态，但不久后其中一条便会发生随机失活。这种失活几乎完全抑制了相应染色体上所有基因的表达。个体发育成熟后，所有从一个胚细胞发育而来的子细胞，其相应的那条 X 染色体同样处于失活状态。因此，成熟雌性个体就是由部分 Mp 型克隆和部分 mP 型克隆细胞共同组成的，其中小写字母表示失活状态。(B) G6PD的两种不同等位基因都由 X 染色体上的基因编码，对热失活处理有不同的敏感性。因此，在本病例中对杂合体的肠部切片组织进行轻微加热，可见编码对热不敏感酶的细胞（图中深蓝色点状）与热敏感细胞的分布。每一小片细胞都是来自于同一个胚细胞，在其胚胎期就已经确定失活的是来自母方的还是父方的染色体。(C) 用淀粉凝胶电泳对两种类型的 G6PD 酶进行分析，结果显示 G6PD 杂合体肿瘤患者的所有肿瘤细胞都表达该酶两种形式中的一种。这表明在肿瘤内所有细胞都是来自一个共同的祖细胞，失活某一条确定的 X 染色体。以上结果提示我们，肿瘤块中的癌细胞构成一个单克隆性瘤。(B，from M. Novelli et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100：3311-3314，2003；C，adapted from P. J. Fialkow，N. Engl. J. Med. 291：26-35，1974.)

或许关于肿瘤单克隆性质的最有力证据来自于对癌细胞染色体的观察。在有丝分裂中期染色体凝集的时候，显微镜下可见肿瘤细胞染色体有一系列异常畸变。通常由一个小概率的遗传学事件所引发的非常特异的染色体异常，在同一肿瘤块中所有细胞都能看到（图 2.19B）。这就清楚地表明，同一肿瘤块中所有恶性细胞都是来源于同一个祖细胞，当此祖细胞染色体的重组发生后，这种变化也都遗传到其所有子代细胞。

虽然很多的结果都为肿瘤集落是单克隆提供了强有力的证据，但肿瘤的发生发展是一个极其复杂的过程。作为反例我们可以设想，在一种组织中 10 个正常细胞同时从正常状态向恶性状态（或至少前恶性行状态）转化，10 个祖细胞连同它们的子细胞都不受控制地异常增殖（图 2.17）。每一个祖细胞都能发育成一个单克隆群体，从总体来看，由这 10 种细胞群体构成的肿瘤就是多克隆性的了。

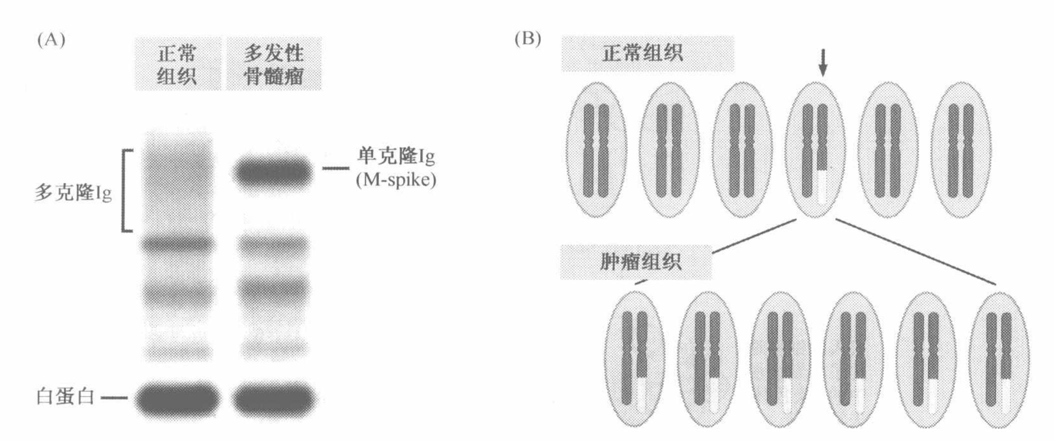


图 2.19 肿瘤单克隆性的其他证明 (A) 在凝胶电泳中，正常血浆 Ig 分子（如抗体）的迁移显示它是一种异质性分子群体（多克隆 Ig，左泳道上图），这种异质性也表明有不同谱系（多克隆群体）的血液细胞参与抗体的产生。但是，在多发性骨髓瘤中只有一种单一类型的抗体分子（称为 M-spike），它是由一个单克隆群体的抗体分泌型肿瘤细胞所产生的。(B) 此图显示的是一种不常见的染色体易位（箭头处），发生在两个非同源染色体之间——红色和黄色染色体；此易位只对一对同源染色体产生了影响。这种发生在具有正常核型细胞群落（上排）的易位，为待研究的特定肿瘤提供了一个特异的标记（图中只显示了一对易位产物中的一个）。由于在某一肿瘤中所有细胞都有这种很少见的易位现象（下排），这就说明它们都是从同一个发生了易位的祖细胞发育而来的。(A，courtesy of S. Chen-Kiang and S. Ely.)

很可能 10 个克隆中的每一个与其他 9 个克隆在某些特性上都具有细微的差别，其中包括群体细胞倍增时间。通过简单的数学知识可以证明，如果一个克隆具有比别的克隆稍微短一点的倍增时间，那么迟早它会长得大于别的所有的克隆，这一克隆也会不断地扩增以至在整个肿瘤块中占据主导地位，使这个肿瘤看起来像一个单克隆群体。实际上，许多肿瘤的发生发展都是需要很漫长的过程的，这就为肿瘤块中某一单克隆群体发展成为主导群体提供了充裕的时间。因此，一个大肿瘤块表现出的单克隆性质，并不能为此肿瘤在最初发展时期也是单克隆提供严谨的证明。

第二个导致混淆的因素是由肿瘤细胞群的遗传和表型的不稳定性导致的。第 11 章我们将会详细讨论，一个肿瘤的细胞群体可以是一个十分均质的细胞集合（成长为一单克隆群体），但很快由于其中不同的细胞各自出现了不同的突变，这一群体又能变得十分异质。这种由突变导致的异质性往往会掩盖细胞是单克隆群体的事实，因为原本所有子代细胞都具有的很多遗传学标记只在某些特定的亚群中才出现。

以上这些容易发生误判的事实使我们对肿瘤的单克隆起源的判断显得更加复杂和困难。但一个已经广泛被认可的事实是，大多数人类肿瘤都是单克隆群体，即从单个的祖细胞开始逐步走向恶性转化。

2.6 癌症在不同人群中的发生频率存在很大的差异性

癌症的本质表明了这是一种机体发生混乱，生物学秩序崩溃的疾病。更具体地说，

肿瘤中的这种无序化状态直接来自于对细胞增殖调节的失控，其不能决定机体的细胞于何时、何地进行增殖。实际上，在机体内发生癌变的机会是很大的。体内多于 10^{13} 个细胞始终携带着这样的遗传信息，使得它们在当时能够持续存活于机体内，在将来还能够再次增殖。这就解释了为什么在贯穿哺乳动物的整个生命过程中，机体内的许多部位都存在细胞增殖失控的风险。

更准确地说，发生肿瘤的风险远远比 $>10^{13}$ 个细胞克隆所表现出来的要高，这个数据只表示了在成年期的任何一个时间点上体内具有的稳定细胞群落的平均值。人的一生平均要形成 10^{16} 个稳定的细胞集落，这个数据已经包含了那些在细胞新陈代谢过程中死亡或新生的情况（几乎每秒会发生 10^7 个生物学事件）。正如我们将会在第 9 章和第 12 章要提到的，每一次经过复杂的细胞生长和分裂过程产生新的细胞，其间都有许多容易出错的地方。因此，机体发生疾病，包括无意中形成的肿瘤细胞，都是很容易的事情。

鉴于每一个很正常的生物学过程（如持续的细胞分裂）都有致癌的风险，那同处于这个世界上的人类也不例外。然而，根据世界各地临床诊断的结果和**发病率**来看，一些癌症发病的风险非常高（表 2.5），而另一些癌症（表 2.5 中未示出）的发病风险却不是那么高。所以我们简单地认为所有癌症在不同人群中的发病风险都一样就显得不正确了。只能说有一些是一样的，而另一些却不是。这个认识让我们重新考虑肿瘤是怎么形成的。

表 2.5 癌症发生和死亡率的地域差异

特定癌症发病风险最高和最低的国家或地区[a]			
癌变位点	发病风险最高的国家或地区	发病风险最低的国家或地区	相对风险 H/L[b]
皮肤（黑素瘤）	澳大利亚（昆士兰）	日本	155
唇	加拿大（纽芬兰）	日本	151
鼻咽	中国（香港）	英国	100
前列腺	美国（非裔美国人）	中国	70
肝	中国（上海）	加拿大（新斯科舍）	49
阴茎	巴西	以色列（德系犹太人）	42
子宫颈（子宫）	巴西	以色列（非犹太人）	28
胃	日本	科威特	22
肺	美国（路易斯安娜，非裔美国人）	印度（马德拉斯）	19
胰腺	美国（洛杉矶，韩裔美国人）	印度	11
卵巢	新西兰（波利尼西亚人）	科威特	8
特定癌症死亡率最高和最低的国家或地区[c]			
癌变位点	死亡风险最高的国家或地区	死亡风险最低的国家或地区	相对风险 H/L[b]
肺，男性	东欧	西非	33
食管	南非	西非	16
肠，男性	澳大利亚，新西兰	中非	15
乳腺，女性	北欧	中国	6

a 引自 C. Muir I. Waterhouse，T. Mack et al.，eds.，Cancer Incidence in Five Continents，vol. 5，Lyon：International Agency for Research on Cancer，1987；由 V. T. DeVita. S. Hellman 和 S. A. Rosenberg 摘录。Cancer：Principles and Practice of Oncology，Philadelphia：Lippincott，1993。

b 相对风险：对于与年龄相关的患病风险或者死亡率，以发病和死亡率最高的国家和地区的数值除以发病和死亡率最低的数值。这些数字涉及与年龄相关的概率。例如，相比于一个国家，另外一个国家 60 岁公民死于某种癌症的相对概率。

c 引自 P. Pisani，D. M. Parkin，F. Bray 和 J. Ferlay，Int. J. Cancer 83：18-29，1999. 该研究将人类划分为 23 个地理区域并且研究了所有地区各种癌症的相对死亡率。

在 100 多种人类癌症中，有很大一部分是由于随机的、不可避免的事件所引起的，因而在不同人群中有相似的发病率。这对于某些儿童肿瘤似乎是正确的。除了针对某些特别的癌症相对稳定的发病率以外，某些因素针对一些特定的人群能显著地提高癌症的发病率。这两大重要因素就是遗传因素和环境因素。不同的人群携带肿瘤易感基因有很大的差异，同时人们所处的环境对肿瘤的发病率也有显著的影响。这里所指的环境因素，从广义上讲，包括了摄入机体的空气、水分和生活习惯，如饮食习惯、生殖行为以及是否吸烟等。

遗传因素和环境因素中，哪个才是造成各地区肿瘤发病率差异的主导决定因素呢？尽管许多疾病相关基因在不同人群基因库中的分布并不一样，但这并不能解释为什么在世界范围内不同癌症的发病率有如此大的差异。关于这一点，通过研究移民者的癌症发病率就能得到很好的证明。例如，日本人患胃癌的风险比美国人要高 6～8 倍（图 2.20）。然而，通过对移民至美国的日本人的研究显示，他们的第一代子女患胃癌的风险就已经与周围的美国人相差无几。对大多数癌症来说，其发病风险还是和“环境”相关，这里的“环境”包括生活环境和生活方式。

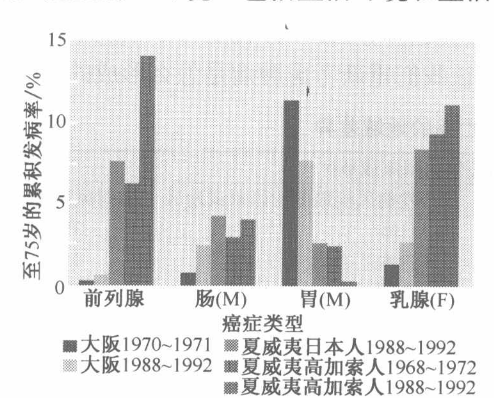


图 2.20　不同国家间癌症发病率的比较　公共卫生记录数据显示了不同国家间同一癌症发病率的显著差异。图中显示了一组癌症在日本和美国夏威夷的发病率数据。图中还显示在日本移民来到夏威夷后，其第一代子女某些肿瘤的发病率就已经与当地居民非常接近。说明了日本和美国人群肿瘤发病率的差异并不是由遗传学差异造成的。（From J. Peto，Nature 411：390-395，2001.）

如表 2.5 所示，某些肿瘤在不同人群中的发病率确实存在巨大差异。在中国，乳腺癌的发病率是美国或北欧地区的 1/6。当排除了遗传因素后，我们可以总结出，只要让她们经历与中国女性的相似的生活环境和生活方式，85％发生于美国的乳腺癌理论上是可以避免的。而即便是在美国人群中间，癌症导致的死亡率也存在着极大的差异：患癌的风险可由某些确定因素的影响而增高。

基督复临安息日会的教友，他们的信仰中反对吸烟、酗酒、吃肉，他们患癌症的死亡率就只有普通人群的一半。

对于研究癌症**病理学**机制的人来说，这些发现使他们推导出一个不容忽视的结论：绝大多数常见肿瘤都是由于一些体外的物质或试剂进入体内，以某种方式攻击和破坏机体组织而引起的。在少数肿瘤中，其发病率的显著差异可能是由于生殖行为的不同和随之引起的女性机体内激素环境的显著变化引起的。

想象一下，如果能避免饮食和生活习惯中的致癌因素，就可以使西方的癌症死亡率下降 50％，在所有疾病导致的死亡中由癌症所致的比率就能够下降到 10％。在这样的条件下，假设在人的一生中每个个体有约 10^{16} 个有丝分裂，我们认为在 10^{17} 个细胞分裂中才会出现一个能够直接或间接导致临床可检测到的癌症。现在，我们知道了虽然有很

多内在的因素可以导致癌症发生，但机体肯定具备一系列高度有效的防御措施来避免或者拖延癌症的发生，使我们在这个星球上能存活 70～80 年。关于这些防御机制的讨论就是贯穿本书的主题。

2.7 某些特定的因素包括生活方式能提高患癌风险

在现代流行病学建立的一个世纪前，人们就发现某些癌症的发生与特殊射线或者生活方式相关联。第一个报道来自英国医生 John Hill，他于 1761 年注意到了鼻癌的发展与长期过度用鼻吸烟有关。14 年后，伦敦的一名外科医生 Percivall Pott 报道了他所遇到的相当数量的青少年阴囊皮肤癌患者，这些患者小时候都有当烟囱清洁工的经历。之后不到三年，丹麦清道夫协会就要求它的成员们每天都要洗澡以去除皮肤上可能的致癌物。这项措施使得欧洲大陆阴囊癌的发病率在一个世纪之后都远低于英国。

从 16 世纪中期开始，在波希米亚的 St. Joachimsthal（今天的 Jáchymov，捷克共和国），银矿被大量开采以用于铸造后来广泛流通的货币“thaler”。在 19 世纪的前 50 年，肺癌这种在当时几乎未知的疾病在矿工中的发病率很高。此外，职业性照射也与特定类型的癌症相互关联。

1839 年，一位意大利医生报道了在修道院中的女性患乳腺癌的概率是多次生育的普通女性的 6 倍。到 19 世纪末人们才确定，某些职业性照射和生活方式与癌症密切相关，并且显然能够导致多种癌症发生。

到 20 世纪前 10 年，人们已经发现了越来越多的致癌物质。那时 X 射线管刚发明出来，操作这些仪器的物理学家患癌症的概率较高，而且肿瘤通常发生于被辐射的位置。这些研究结果终于在很多年后解释了为什么 St. Joachimsthaler 的矿工很容易患肺癌：从矿井中开采出来的矿石具有很强的放射性，这就大大提高了矿工肺癌的发病率。

关于环境暴露和肿瘤发生之间的联系，也许最引人注目的要算两组流行病学家于 1949 年和 1950 年做的一项研究，据他们报道：重度吸烟者一生中患肺癌的风险要比不吸烟者高 20 倍。这项重要研究的原始数据列于表 2.6。这些流行病学的相互关系对随后的癌症研究是非常重要的，它们提示了癌症的发生一般都有特定的、可归属的原因，并且终有一天将会追溯到这些原因与组织恶性转化之间的因果关系。在 1949～1950 年的报道后半个世纪内，流行病学家又发现了一系列与某些癌症相关的环境和生活方式的因素（表 2.7）。在其中的一些案例中，研究者发现了特殊的生物学机制，上述因素能够通过这些机制使某些癌症的发病率增加。

表 2.6 每日吸烟者患肺癌的相对风险[a]

	终生不吸烟者	吸烟者			
近期每人患病前每日吸烟数量	—	≥1，<5	≥5，<15	≥15，<25	≥25
相对风险	1	8	12	14	27

a 相对风险表示了相对于不吸烟者患肺癌的风险，并将不吸烟者患肺癌的概率定义为 1。

引自 R. Doll and A. B. Hill，BMJ 2：739-748，1950.

表 2.7　已知的人类癌症可能诱因

美国已知或者疑似与人类癌症相关的环境和生活方式的因素[a]	
类型	总病例中的百分比[b]/%
职业暴露导致的癌症	1～2
生活方式导致的癌症	
烟草相关（位点：肺、膀胱、肾）	34
饮食相关（蔬菜摄入过少，亚硝酸盐和盐摄入过多）（位点：胃、食管）	5
饮食相关（高脂肪，低纤维，烧烤/油炸食品）（位点：肠、胰腺、前列腺、乳房）	37
烟草和酒精（位点：口腔、喉）	2

引发癌症的致癌试剂[c]	
癌症	暴露物
阴囊癌	烟囱烟凝结物
肝脏血管癌	氯乙烯
急性白血病	苯
鼻腺癌	阔叶木材粉尘
骨肉瘤	镭
皮肤癌	砷
间皮瘤	石棉
睾丸癌	己烯雌酚
口腔癌	鼻烟

a 改编自 Cancer Facts and Figures，American Cancer Society，1990.

b 大量的癌症都是由高热量饮食结合这些生活方式因素共同作用引起的。

c 改编自 S. Wilson，L. Jones，C. Coussens and K. Hanna，eds.，Cancer and the Environment：Gene-Environment Interaction，Washington，DC：National Academy Press，2002.

2.8　某些化学试剂能够诱发癌症

煤焦油冷凝物，与 Percivall Pott 研究中的致癌物相似，在 20 世纪初被用来诱导家兔产生皮肤癌。在家兔耳部皮肤的同一处反复涂抹，几个月后便会诱发出恶性肿瘤。

这项研究结果最早由 Katsusaburo Yamagiwa 在 1915 年报道，但在当时没有引起科学界的注意（图 2.21）。现在回过头来看，此研究是一项巨大的进步，因为它直接体现了化学物质（内含于煤焦油）的致癌作用。同样重要的还有 Yamagiwa 和 Peyton Rous 的研究工作（在第 3 章描述），证明了在实验动物身上人工诱发癌症是能够实现的。在取得这些突破之前，研究者只能等待肿瘤自发的在野生或者驯养的动物体内形成。而现在，癌症能按照规划好的日程产生，通常需要对实验动物进行几个月的处理。

直到 1940 年，英国化学家从煤焦油中提炼出几种能显著致癌的组分，它们都能够在小鼠的皮肤上**致癌**。组分中的 3-甲基胆蒽、苯［α］并芘、1，2，4，5-二苯基-［α，h］-蒽都是普通的燃烧产物，其中一些碳水化合物，特别是苯［α］并芘，随后在烟叶燃烧后气体的浓缩物中同样被发现（图 2.22）。这些发现提示我们，某些进入体内的化学物质能够扰乱细胞和组织，并且最终导致肿瘤发生。X 射线也是如此，能够通过一种表面上看起来不同的作用机制来诱发癌症。

在以上研究结果出现的同时，一项独立研究结果表明肿瘤是一种传染性疾病。正如将在第 3 章详细描述的一样，在 20 世纪前 10 年，研究者发现病毒能感染小鸡并导致白

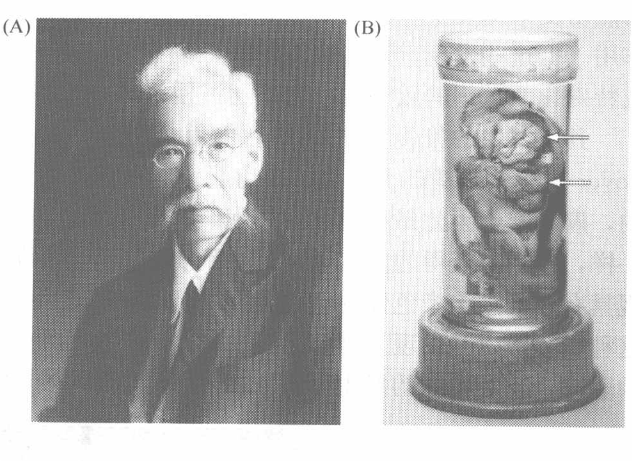


图 2.21 首次通过化学致癌物诱导产生肿瘤 （A）1951 年，由 Katsusaburo Yamagiwa 首次通过化学致癌物反复处理兔耳诱导产生恶性肿瘤，他用的试剂为煤焦油。（B）Katsusaburo Yamagiwa 诱导兔耳产生的皮肤癌标本（箭头所示处），由东京大学医学博物馆保存。此肿瘤经煤焦油处理 660 天后收集保存。（Courtesy of T. Taniguchi.）

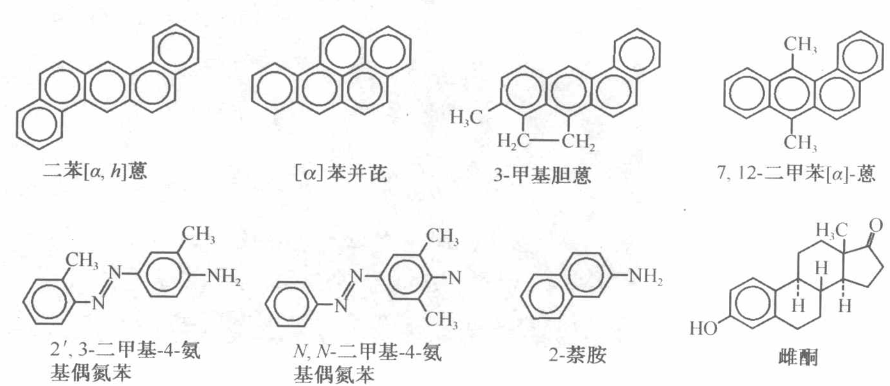


图 2.22 致癌性烃的结构 这些化合物来自有机物（如含碳物质）的不完全燃烧。这里的每种化合物的结构在 1940 年前就已确定，每一个都代表了一类具有潜在致癌性的化合物。上排四个化合物同属多环芳香烃类（PAH）。（From E. C. Miller, Cancer Res. 38：1479-1496，1978.）

血病和鸡肉瘤。到了 20 世纪中期，又发现了一系列的病毒能在家兔、小鸡、小鼠和大鼠中诱导产生肿瘤。由此得出，探寻人类肿瘤产生的原因可以从三个不同的方面入手：化学的、病毒的、物理的（如射线）。

2.9 物理或化学致癌物都是通过诱导突变起作用

这三种致癌物的致癌机制是如此复杂以至于让人们困惑不清，直到人们对果蝇的遗传学研究取得了一些成果时，针对此机制的研究才取得了巨大的进展。1927 年，Hermann Muller 发现 X 射线照射可以诱导黑腹果蝇基因组发生变异。更重要的是，这说明了动物经过特殊的处理方法，尤其是辐射作用，其基因组是可以发生改变的，其所包含的遗传信息也就发生了改变。同时，这也表明了 X 射线诱发癌症的一种机制：也许经过辐射作用能使正常细胞的基因发生突变，而这种突变就很可能导致细胞向恶性状态转化。

到 19 世纪 40 年代末，许多在第一次世界大战中在芥子气战时使用的烷化剂也被证

明能**诱发**果蝇发生基因突变。随后，在实验动物体内证实了它们中的大部分都有致癌的作用。据这些发现，许多遗传学家推测癌症是一种基因突变的疾病，而那些如X射线或特殊化学试剂的致癌剂，就是通过使机体发生基因突变而致癌的。

其实类似的推测在更早些时候就出现了。早在1914年，德国生物学家Theodor Bover在前人的基础上提出，作为遗传信息载体的染色体，在癌细胞内是处于异常状态的，癌细胞也因此是一种突变细胞。但他的发现与同时期很多别的关于癌症起源的推测一样，在当时获得的支持很少。直到1960年，在许多慢性粒细胞白血病（CML）中发现具有异常结构染色体的细胞占了大部分，是这种肿瘤的一个显著的特征（图2.23），这种染色体以其发现地被命名为费城染色体。这种在此癌症中大量出现的染色体异常现象表明，它与肿瘤的发生有着密切的因果关系，虽然在当时很难证明。

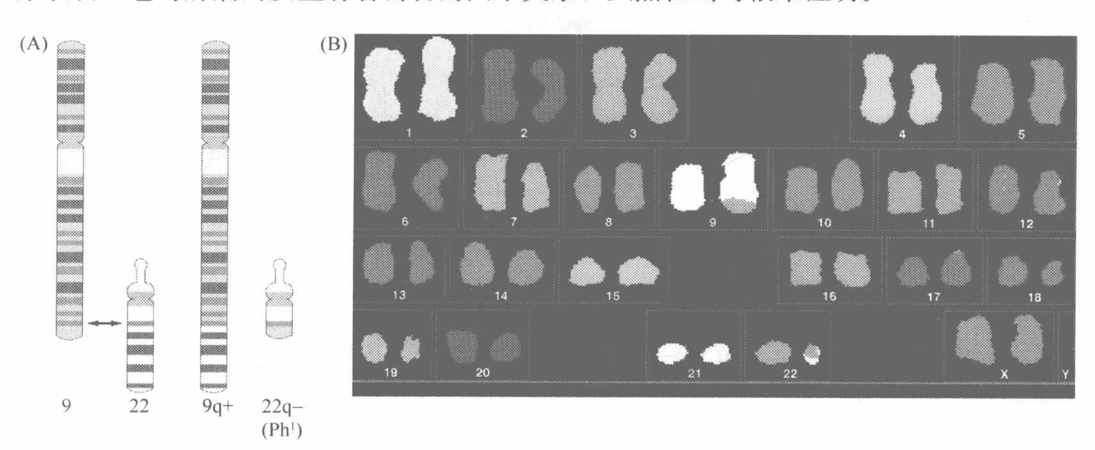


图2.23　费城染色体的结构　对慢性髓细胞性白血病细胞中期染色体带型的分析中，第一次发现了绝大多数CML细胞中存在特征性的小染色体（称为费城染色体或Ph1）。（A）通过对染色的中期染色体进行光学显微镜观察确定的带型示意图。由于产生两个改变的染色体（9q＋，22q－）的染色体易位是相反的（如两条染色体分别发生了丢失和获得），因此发生交换的染色体臂的大小是不相等的，导致22号染色体被极大地截短了。箭头指示的是发生交换的位点，称为易位断裂点。（B）CML易位引发的肿瘤细胞基因组型的细小改变在光谱核型分析中清晰可见，该方法使用到染色体特异性的探针，联合应用荧光染料并且由计算机着色，以观察CML细胞的全部染色体补体。图中显示出两条9号染色体中的一条，在其长臂获得了一段淡粉色的片段（该颜色用于表示22号染色体）。相反，其中一条22号染色体的长臂末端则获得了一段白色区域（9号染色体的特征）。（A，from B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002；B，courtesy of Thomas Ried and Nicole McNeil.）

1975年，UC Berkeley的细菌遗传学家的研究结果更加证明了致癌剂能使基因突变。经过在小鼠和大鼠体内数10年的实验证明，不同的化学致癌剂的致癌能力差别很大，这种差距甚至达到了100万倍。举例来说，1mg的黄曲霉素（存在于花生和小麦中的霉菌内的化合物），其致癌潜力是人工合成的对二氨基联苯的10 000倍。Ames提出，如此多的致癌化合物是否也是基因突变诱变剂，那些具有强致癌作用的化合物是否也具有很强的基因突变诱变作用呢?

在Ames探究这个问题的初期，就遇到了一个麻烦：没有一个有效的方法来衡量各

种化学试剂诱发突变的能力。因此他想出了一个好办法来解决这个问题。他用各种不同的化学致癌剂分别处理沙门氏菌，然后让其在皮氏培养皿内生长，通过计数细菌形成的集落数来衡量各种致癌剂对细菌的诱发突变能力。

具体来说，Ames 采用了一种突变沙门氏菌株，此菌株在不含组氨酸的培养基中不能生长。此突变位点被认为具有回复突变的能力。当暴露于诱变剂之下的细菌在此位点发生了回复突变后，具有此野生型基因的细菌就能在 Ames 氏选择培养基中生长，直至形成肉眼可见的克隆（图 2.24）。

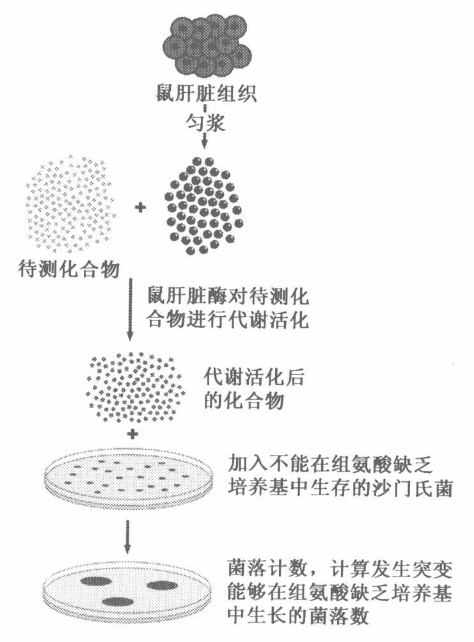


图 2.24 测定致突变能力的 Ames 试验 Ames 试验能定量评估待测化合物的致突变潜能。首先要将大鼠（或其他动物）的肝经匀浆器磨碎，释放出能把化合物代谢激活成致突变状态的酶。然后将大鼠肝匀浆液（褐色点）与待测化合物（橙色）混匀，这样能使待测化合物转变成有活性的状态（红色）。再将此混合物（仍含肝匀浆产物，未示出）加入到有突变沙门氏菌（绿色小点）的培养皿中，此突变菌需要组氨酸才能生长，而此培养基不含组氨酸，因此，只有那些发生了回复突变，变成不依赖组氨酸的基因型（和表型）才能在此培养基上生长，而且它们每一个都会长成一个肉眼可见的克隆（绿色），表示经过活性化合物的处理有多少细菌发生了回复突变（基因型和表型）。

从原理上讲，Ames 只需将待测试的化合物加入到有这种突变沙门氏菌株的培养皿中即可，通过对形成的菌落进行计数，就能衡量此化合物的致突变能力了。但实际操作起来就会觉得障碍重重了。经过对多种化学致癌物的详细研究显示，当某种致癌物分子进入实验动物体内组织后，它们会代谢成别的化学物质。在很多情况下，相比于最初引入体内的化合物，其代谢产物更能诱发癌症的发生。这些代谢产物一般都有很高的反应活性，能与细胞中的很多分子如 DNA、RNA 和蛋白质形成共价键。

这种最初引入实验动物体内未经修饰的化合物叫**前致癌物**，它们经过代谢能变成有活性的致癌物，叫**终致癌物**。这种化合物间的转变使我们对 Ames 的致突变实验产生了疑惑。如果许多化合物都需要经过代谢才能被激活成有活性的致癌物的话，那也就是说在代谢激活前它们是不具备诱发突变的能力的。鉴于细菌与哺乳动物在新陈代谢上具有极其显著的差异，在实验动物的组织中出现的前致癌物代谢激活过程，在 Ames 的沙门氏细菌中应该是很难完成的。

这就使得 Ames 在借鉴前人工作的基础上，为自己的致突变实验增加了一个额外的步骤。众所周知，许多化合物进入机体后是在肝脏发生代谢转变成其他的物质。那么，很多代谢过程也就可以在试管里实现，只要把化合物和肝匀浆物简单混合即可。所以 Ames 把大鼠肝匀浆物与待测的化合物混合，然后加入到有沙门氏菌的培养皿中（现在

我们知道了在肝内催化前致癌物代谢激活的酶，在机体中的正常作用其实正好相反，是参与化合物的**解毒作用**的。见 12.6 节)。

把肝匀浆产物加入到沙门氏菌培养物中后，Ames 的致突变潜力实验就进行得很漂亮了。通过这项实验证明了许多已知的致癌物同时也是具有致突变潜力的。更重要的是他发现了这两种能力之间的关系。强致癌化合物同时也是很强的致突变剂。那些不是很强的致癌剂诱导突变的能力也较弱。这些潜能的相关性大约跨越了 5 个数量级（图 2.25)。

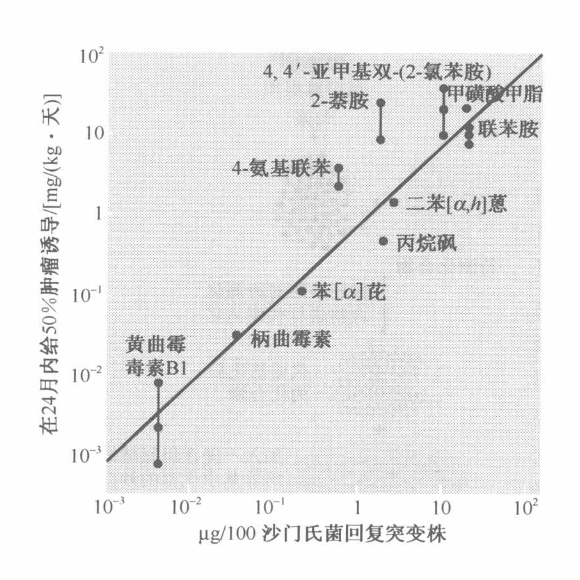


图 2.25　致癌效力和致突变效力　这张重对数坐标图体现了一组化学试剂（纵坐标）的致癌效力与其致突变效力的关系，致癌效力源于对实验动物（大鼠或小鼠）的处理，致突变效力由 Ames 试验定量（图 2.24)。横坐标和纵坐标的数据定为得到一个可观察效应（50%处理过的动物生长出肿瘤或突变沙门氏菌长出 100 个克隆，即回复突变体）所需的化合物总量，具有最强致癌和致突变效力的化合物出现在图左下方。请注意图中每个参数都跨越了 5 个数量级。(Adapted from M. Meselson et al., in H. H. Hiatt et al., eds., Origins of Human Cancer, Book C: Human Risk Assessment. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977.)

如我们所读到的，在 Ames 的工作约 1/4 个世纪前，人们就注意到致癌剂同时也是诱变剂的现象了。尽管如此，他的研究结果还是极大地鼓励了那些希望探寻癌症起源的工作者们，因为这些结果说明了致癌剂与致突变剂之间存在如此直接的联系。因此他们推测：既然 Ames 已经证明在细菌里那些化合物的诱导突变的能力，而细菌与动物细胞的基因组都是由相同的物质——双链 DNA 构成的，很可能那些能使沙门氏菌基因组突变的化合物同样也能诱导动物细胞基因组发生突变。因此，“Ames 试验”同样应该可以用来测试不同化合物进入哺乳动物体内后诱导突变的能力。而且根据致癌潜力和致突变潜力之间的关系，埃姆斯试验可以检测出许多物质的致癌能力，进而能够推测出它们对人类健康的危害程度。到 1976 年，Ames 及其研究组已经报道了 300 多种有机化合物的致突变效力。随后相继又发明了其他的很多实验来测试化合物的致突变效力（见信息栏 2.1)。

由 Ames 的结果得到另一个推论：如果真如 Ames 所认为的，致癌剂也同时是致突变剂，那么，这些化学试剂的致癌效力其实是直接源自它们对组织细胞诱导产生基因突变的能力。更进一步来说，由此看来由化学致癌剂产生的癌细胞中将不可避免的含有突变基因。不管这些变异的基因具有怎样的特性，它们都与肿瘤细胞的异常增殖有关。

信息栏 2.1　其他一些用以评估致突变效力的实验帮助评估可能的致癌性　在测试致癌化学剂的致突变效力的众多实验中，Ames 试验只是其中之一。还有很多别的实验是把哺乳动物细胞直接暴露于待测的化合物中，然后用一系列不同的生物数据读出仪器来测试化合物的致突变效力。例如，姐妹染色单体交换（SCE）实验用来测试在细胞生长-分裂周期的后期（如 G_2 期）时，同一条染色体上的两条姐妹染色单体之间是否发生了互换。很多致突变剂都能诱导发生 SCE，也能诱导细胞核碎片的生成，即产生细胞微核。通过遗传学我们可以检测哺乳动物细胞由于变异而导致的胸苷激酶或 HGPRT 酶（次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶）丢失。我们还可以通过细胞分裂中期核型分析来检测由待测化合物引起的染色体异常。还有一种实验可以检测如 G_1 或 G_2 期细胞 DNA 标记的程度（详见第 8 章）；其中的“非 S 期标记”，有时称为“期外 DNA 合成”，也是检测基因组 DNA 受损很好的指标，因为这类 DNA 合成代表着细胞进行 DNA 损伤修复的一个关键步骤。

没有一个实验是可以完美证明待测物的致癌效力的。拿 Ames 试验来说，它的敏感性（已确定的致癌剂鉴定为致突变剂）约为 54%，特异性（把非致癌剂鉴定为非致突变剂）约为 70%。

这个原理适用于由 X 射线导致的癌症。因为 X 射线同是致癌剂与致突变剂，那它同样是由于致突变作用而引发肿瘤的。这项研究结果对探寻癌症的起源产生了深远的影响。虽然到现在还未完全证明，但通过癌细胞突变的基因来理解癌症这种疾病是一定可行的。

2.10　某些肿瘤与基因突变相关

基因突变与癌发生之间关系的初探，无疑为我们研究肿瘤的起源带来了一缕曙光。也许很多肿瘤的发生就是直接源自于物理或化学致癌剂的基因突变作用。这些化学诱变剂，尤其是前致癌物，不需要刻意的从含碳化合物或煤焦油的燃烧产物中提取出来。那些天然存在于食物中或在食物加工过程中产生的物质里就含有这些化合物，同样能诱导产生肿瘤。即使食物中不含终致癌物，在肝脏中进行的物质代谢或肠中大量存在的细菌也能成功地创造出那些致突变，进而致癌的化学物质。

随着对癌症起因研究的进行，那些能导致人类细胞发生突变的化合物看起来好像的确都能致癌。但反过来却不尽然：那些致癌的化合物并不都能诱导发生突变（见信息栏 2.2）。

信息栏 2.2　不是所有的致癌剂都有致突变作用　在 20 世纪 90 年代初期，研究表明致癌剂-致突变剂的这种等同关系好像不存在了。那时候做的大量 Ames 试验显示，约有 40%的啮齿类动物致癌剂经过沙门氏菌突变实验却没有表现明显的致突变作用。因此早期 Ames 试验结论看来需要进行不小的修改了：一些致癌剂发挥作用是通过其诱导 DNA 产生突变，而另一些却是通过非遗传学机制导致肿瘤的发生。在第 11 章我们会再次讲到这种非致突变型致癌剂，即促癌物。

1991 年，Ames 和其他人用他的实验对一系列食品中的天然成分和人工成分的致突变效力进行了分类，其中包含了众多广泛且大量存在于西方饮食中的植物。针对这些从食用植物中提取出的化合物的分析结果让人大吃一惊，因为这些植物中存在着成千上万的有毒化学物质，它们构成了一套防捕食系统，保护自身不被昆虫和大型动物吃掉。而这些天然存在的物质无形中也具有一种副作用——能导致基因突变（表 2.8）。

表 2.8 **Bruce Ames 对日常食物致癌性的鉴定名单节选**[a]

食品	化合物	浓度
黑胡椒	苯哌丙烷	100mg/g
普通蘑菇	伞菌氨酸	3mg/g
芹菜[b]	呋喃香豆素类化合物	1μg/g，0.8μg/g
大黄	蒽醌	不定
可可粉	可可碱	20mg/g
芥末，辣根	异硫氰酸烯丙酯	不定
苜蓿芽	刀豆氨酸[c]	15mg/g
烧烤类[d]	大量	不定
咖啡	咖啡酸	11.6mg/g

a Ames 收录了 37 种天然存在的化合物，都已在实验动物身上鉴定出有致癌性；以下每种食物都含至少一种此类化合物：苦艾酒、多香果、茴香、苹果、杏、香蕉、罗勒、甜菜、椰菜、芽甘蓝、卷心菜、香瓜、香菜、豆蔻、胡萝卜、菜花、芹菜、樱桃、红辣椒、巧克力、肉桂、丁香、咖啡、羽衣甘蓝、紫草凉茶、胡荽、玉米、葡萄干、莳萝、茄子、菊苣、大蒜、柚子、葡萄、番石榴、蜂蜜、蜜瓜、山葵、柠檬、小扁豆、莴苣、甘草、酸橙、肉豆蔻、芒果、牛至属植物、薄荷、蘑菇、芥菜、洋葱、柑、辣椒粉、荷兰芹、欧洲防风草、桃子、梨、豌豆、黑胡椒、菠萝、李子、马铃薯、萝卜、覆盆子、大黄、迷迭香、芜菁甘蓝、鼠尾草、香薄荷、黑芝麻、大豆、星茴香、龙蒿、茶、百里香、番茄、姜黄。

b 这些化合物在以上患病的植物中的含量可提高 100 倍。

c 刀豆氨酸由于释放氧自由基间接具有毒性，或许这与清除含有刀豆氨酸的蛋白质的炎症反应相关。

d 一般来说，我们每天会从面包皮、烤面包、高温加工的烤肉焦皮中摄入几克的致癌物。

改编自 B. N. Ames，Science 231:1256-1264,1983；B. N Ames and L. S. Gold，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7777-7781,1990；and L. S. Gold，B. N. Ames and T. H. Slone，Misconceptions about the causes of cancer，in D. Paustenbach，ed.，Human and Environmental Risk Assessment Theory and Practice，New York：John Wiley & Sons，2002，1415-1460.

人类大部分肿瘤是直接由于摄入了这些致癌食物引起的，虽然仍有许多有待研究的地方，但大量的研究结果证明了此观点。例如，那些未煮前颜色是红色的生肉（如牛肉、羊肉等），经过高温的处理能产生如杂环胺类的物质，都有强致突变作用（见 12.6 节）。

但此观点很难得以证明。在我们的饮食中，每一种源自植物或动物的食品都有成千种不同的化学物质，而证明这种模式的困难在于几个原始资料，一个是我们日常饮食的动植物食品含有数千种各种各样的化学物质，它们以许多各种不同的浓度存在于食物中。这些化学物质摄入体内后几乎所有的都开始了代谢转化，先经过胃肠道然后到肝脏，所以在体内的各种化学物质的数量是无法计算的。而且每种物质摄入体内后，也许会在某些细胞内聚集，也许会很快地代谢分解而排泄，这就大大加深了问题的复杂性。

另外，由于各种物质在不同细胞内的代谢过程不同，它们的实际致突变能力在不同的细胞中也显得差异巨大。举例来说，某些细胞（如肝脏中的**肝细胞**），能产生出高浓度的生化物质，以失活和清除那些有致突变作用的化合物。而另一些细胞，如成纤维细胞，表达这种生物化学物质的浓度就低了很多。总的来说，将食物的致突变效力与在我们体内的实际致突变和致癌效力相关联，已经远远超出了我们现在的能力范围——这是一个极其困难和复杂的问题（见信息栏 2.3）。

信息栏 2.3　对人类致癌物的探索　在理想状态下，对人类重要致癌剂的鉴定应该辅助应用体外实验，如 Ames 试验和体内实验——将实验动物暴露于可能引起癌症的试剂中（见 2.8 节）。然而，各种实验并不能很好地鉴定出重要的致癌物。但是我们可以通过流行病学的研究来掌握它们的致癌效力。例如，最重要的致癌物烟草，由于其对啮齿类动物的致癌效力相当微弱，以至于我们检测不到其实际效力，还有另外一种致癌物——石棉，针对其开展的体内、体外实验结果均不理想。相反，一些常规药物，如苯巴比妥和异烟肼在 Ames 试验中表现出很高的致癌效力，糖精在雄性老鼠体内也表现出致癌效力（见信息栏 11.16）。但是，流行病学证据最终显示，长期暴露于这些化合物的人患癌症的风险并没有实质性地增加。因此，真正有效的、前瞻性检测人类致癌剂的实验仍有待进一步开展。

2.11　总结与展望

从 19 世纪后半叶到 20 世纪前半叶，关于癌症和癌细胞的描述就仅限于相对于正常细胞群体而言，它们表现出没有节制的疯狂生长。另外，许多肿瘤似乎主要是由一个细胞从正常状态跨越到恶性状态后继续分裂产生的子细胞构成的，而且它们的数量会扩增到数十亿级从而形成大块的肿瘤。这种现象使人们开始思考肿瘤细胞的本质及其恶性转化的机制。似乎每一个肿瘤块都主要由一个模子般的转化细胞的复制品组成。如果我们清楚了细胞失去控制增殖的原因，那肿瘤其他方面的问题也就好解决了。

根据现有的观察和实验技术，想要准确地揭示为何细胞改变自己的行为，把自己从一个正常细胞转化为一个恶性增殖的细胞，看起来是相当困难的。致癌剂就等于致突变剂的理论，一定程度上揭示了肿瘤的发展和癌细胞的异常生物学行为是与细胞基因变异分不开的。也许在肿瘤细胞里确实存在调控其恶性增殖的基因，而发现这种基因和研究其作用机制的路还很漫长。没有人知道人类基因组中有多少个基因，应该怎样去分析它们。如果突变基因的确在癌症发生过程中扮演着重要角色，那么它们应该在整个基因组中只占众多基因的很小一部分，就像藏在干草堆里的针，而基因组这个干草堆的大小却是难以估量。

这个关于肿瘤起源的理论后来又由于两个重要的发现而变得模棱两可：首先，许多致癌剂的 Ames 试验结果都显示没有致突变作用；其次，某些病毒感染似乎与一小部分但却很重要的癌症的发病率密切相关。不知何故，它们与诱变致癌剂和细胞突变基因一样，都有致癌的能力。

19 世纪 70 年代中期，DNA 重组技术，包括基因克隆技术，对生物医学研究领域产生了重大影响。虽然分离和鉴定基因的新技术在不断改进，但是至于如何继续开展它们来寻找复杂的致癌基因，癌症研究者们仍然比较迷茫。但是有一点是肯定的，即癌症的病理发生过程（疾病发展）在分子水平迟早是要被阐述和理解的。无论如何，通过我们对 DNA、RNA 和蛋白质深入的研究了解可以阐明众多的生物学过程，那我们也就一定可以靠它们来解决癌症的问题。

最后，打破这种僵局的是来自于对致瘤病毒研究的突破，虽然它们在人类癌症发生过程中起着次要作用。致瘤病毒在遗传学上比较简单，但却有潜在的致癌能力。为了理解这些致瘤病毒和它们的重要性，我们需要再次回到 20 世纪初，面对近代癌症研究的

另一个根源。请看第 3 章。

重要概念

- 19 世纪发现一个生物体的所有细胞都来自于受精卵，这个发现得知了肿瘤不是异物而是来自于正常组织。肿瘤紊乱的组织结构表明了癌症是一种细胞功能失常疾病。
- 肿瘤可以是良性（局限性，非侵袭性）或者恶性（侵袭性，转移性）的。转移是癌症死亡的主要原因。
- 根据来源组织（上皮、间叶、造血和神经外胚层），癌症分为四类。
- 事实上，体内所有的细胞类型都能引起癌症，但是大多常见的人类肿瘤来自于上皮组织——称为癌。大多数癌症分为两类：来自于形成细胞保护层的鳞状细胞癌和腺上皮的腺癌。
- 非上皮肿瘤包括：①肉瘤，来自于间充质细胞；②造血系统恶性肿瘤，来自于循环和免疫系统细胞；③神经外胚层肿瘤，来自于神经系统。
- 一些肿瘤不适合上述分类。而且，有时由于肿瘤细胞已经去分化，所以其来源无法鉴定（失去了组织特异性的特点），这类肿瘤称为退行性肿瘤。
- 肿瘤具有各种不同的异常程度，从良性肿瘤到转移瘤都有。由此可以看出癌症的发展是一个多阶段、多步骤的过程。
- 良性肿瘤可能是增生性或化生性。增生组织除了细胞数量过多外似乎是正常的，而化生组织则是由一种通常不是在此位置的正常细胞类型取代一种正常的细胞类型。化生通常发生在上皮过渡带。
- 发育异常型肿瘤中均为细胞学异常的细胞。这种异常结构是良性肿瘤和恶变前肿瘤之间的过渡阶段。腺瘤状肿块（腺瘤、息肉、乳头状瘤和疣）是上皮瘤，由于它们未突破基底膜而被认为是良性的。
- 突破基底膜并且侵入下层组织的属于恶性肿瘤。更进一步的异常是转移瘤，肿瘤在体内不同部位转移扩散。转移不仅有侵袭突破基底膜的能力，而且还获得了运动和适应周围新环境的特性。
- 运用遗传学和生物学标记研究得知，肿瘤是单克隆（来源于同一祖先的细胞）而不是多克隆（来源于不同的细胞群体），尽管有很多因素会掩盖了肿瘤起源的真实面目。
- 一些癌症（如一些儿科癌症）在国与国之间发病率的差异是非常显著的，而且不能简单地归结于由于偶然因素而导致的生物学过程异常。遗传和环境的差异也许能很好地解释这种现象。事实上，流行病学研究已经显示国家之间不同的环境因素在癌症发病率中是主要的决定因素。
- 实验室研究结果明确指出化学和物理试剂（烟草、煤灰、X 射线）能够致癌，这很好地支持了流行病学研究结果。然而，当发现病毒引起白血病和鸡肉瘤时，癌症是一种传染性疾病的可能性也出现了。
- 1927 年，将果蝇暴露于 X 射线能诱发突变为癌症的发生提供了可能的机制——物理或化学试剂致癌。到 1950 年，一系列的化学试剂被证明能诱发果蝇的突变，并且使实验动物致癌。这就引起了人们的思索，也许癌症是一种基因突变疾病，并且致癌

物是由于其具有诱导基因产生突变的能力而致癌的。

- 1975 年，Ames 试验发现许多致癌物是诱变剂，这就支持了以上观点。另外的研究显示了几乎所有诱导机体发生突变的化合物都似乎是致癌物，但反过来却不尽然。因此，一些致癌物通过诱导 DNA 产生突变而致癌，而其他则是通过非遗传机制来促进肿瘤发生的。这些非诱导突变型致癌物称为促癌剂。
- Ames 试验和其他相关实验的结果（虽然还没有彻底得到证明）告诉我们，在人类癌症中很大一部分，其发生都是直接由于摄入了一些致突变进而致癌的食物。

思考问题

1. 一个训练有素的病理学家通过什么来观察鉴定肿瘤的组织起源？为什么对于有些肿瘤（5%～10%）究竟起源于哪个组织进行判定特别困难？
2. 在特定的环境下，所有同类型的肿瘤都可以追溯到特定的胚层，而有些其他类型的肿瘤，却与胚层没有这样的相关性。哪些肿瘤可同时符合这两种分类呢？
3. 什么证据使我们相信癌症来源于自身机体组织，而不是源于侵入体内的外来物，即不是源于外界（非自身）？
4. 对于肿瘤细胞是单克隆性的争论激烈到了什么程度？哪些观察现象和逻辑推理影响了肿瘤单克隆性的结论？
5. 我们如何评估有多少癌症的发生是可以避免的（通过合理的生活方式），以及有多少癌症因为与生活方式关系不大而具有稳定的发病率？
6. Ames 试验在检测各种试剂的致癌性时有什么局限性？
7. 如果没有能够直接检测在癌细胞中存在突变基因的方法，那通过什么能够判定癌症是一种细胞突变疾病？

参考读物

Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 231, 1256–1264.

Bickers DR & Lowy DR (1989) Carcinogenesis: a fifty-year historical perspective *J. Invest. Dermatol.* 92, 121S–131S.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S & Wingo PA (2000) Cancer statistics 2000. *CA Cancer J. Clin.* 50, 7–33.

Peto J (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411, 390–395.

Pisani P, Parkin DM, Bray F & Ferlay J (1999) Estimates of worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 83, 18–29.

Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK et al. (1990) Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 50, 7415–7421.

Wilson S, Jones L, Coussens C & Hanna K (eds.) (2002) Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction. Washington, DC: National Academy Press.

（黄常志　罗　清）

第3章 肿瘤病毒

从1909年10月起，一种鸡类肿瘤……在实验室开始传播。这一新型生长集落在行为学上表现出了完全的肿瘤特性，而且由于它的传播途径是非细胞依赖的滤液，我认为这种传播模式肯定具有重要的意义。

Peyton Rous，癌症学家，1911年

病毒能够导致广泛的人类疾病，从狂犬病到天花，甚至到普通的感冒。绝大多数的传染性媒介物的危害作用都是通过其能在被感染的宿主细胞内增殖，杀死宿主细胞，并释放能够感染附近其他宿主的子代病毒颗粒的能力实现的。病毒引发**细胞病变**（杀死细胞）的作用，结合他们能够在组织中快速传播的能力，使这些媒介物在所到之处造成了广泛的破坏。

某些病毒具有独特的复制周期，能够产生与普通病毒不一样的作用。有些病毒并不杀死被感染的细胞，而是迫使该细胞无限的增殖。这类病毒通常被称为肿瘤病毒，它们能够引发癌症。

在20世纪70年代，人们曾经集中研究肿瘤病毒，因为它们被怀疑是人类很多常见癌症的发病原因。随后十年中所收集到的证据并不能证明这一观点，这些证据显示只有一小部分的人类肿瘤是由病毒引起的。但是，这条研究路线被证明对癌症学家是宝贵的，对各种肿瘤病毒的研究为揭开人类癌症很多长期隐藏的秘密提供了钥匙，其中也包括与肿瘤病毒感染不相关的绝大部分癌症。

正如我们将见到的，在20世纪中肿瘤病毒的研究拥有起伏不定的历史。这些传染性的媒介物发现于20世纪的第一个10年，随后便从科学的舞台中心退出。半个世纪之后，对这些媒介物的兴趣又重新燃起，并于20世纪70年代达到肿瘤研究狂热的最高峰。

肿瘤病毒能引发癌症的能力驱使很多研究者来仔细探寻它们是如何成功引发疾病的。绝大多数此类病毒持有相对简单的基因组，包含少量的病毒基因，而另外一些病毒却能够控制被感染的细胞及其宿主的更复杂的基因组，并且能够重新指导细胞向新的方向生长。这种行为表明肿瘤病毒具有非常高效的基因，能干扰被感染宿主细胞本身复杂的调控网络。

通过研究肿瘤病毒和它们的作用机制，研究者改变了癌症研究的所有关注点。癌症成为一种基因疾病，并且因此较容易通过分子生物学和遗传学工具进行分析。在这一故事开始时，没有人能够预测这些复杂的肿瘤病毒将会对人类癌症发病机制的研究带来怎样革命性的影响。

3.1 Peyton Rous发现了鸡肉瘤病毒

在19世纪的最后20年中，Louis Pasteur和Robert Koch研究发现了引发痢疾、霍

乱、狂犬病和其他一些疾病的传染性媒介物。在这个世纪末，依据它们在过滤中的特性，这些媒介物被分为两个不同的种类。能够被滤膜的膜孔拦截的传染性媒介物溶液被认为含有细菌，而其他能够穿过滤膜的媒介物则被划分为病毒。基于这个标准，引起狂犬病、足口病和天花的媒介物被划归为病毒。

癌症也被认为是一种传染性疾病。早在 1876 年，俄国的一位研究者就报道了肿瘤由一只犬到另一只犬的传递：将取自的第一只犬的肿瘤组织块移植到第二只犬体内，几周后在该位置长出了肿瘤。随后很多其他类似的实验分别使用了大鼠和小鼠的肿瘤，也获得了成功。

这些早期试验的重要性至今仍充满争议。一些研究者将这些结果视为证明癌症是能够传播的疾病的证据。而其他人则不屑于这些移植试验，因为在他们眼中，这些工作仅能说明肿瘤像正常组织一样，能够从一只动物身上切下并且在第二只动物的身体上移植生长。

在 1908 年，两位哥本哈根的研究者报道称，他们成功地从鸡白血病细胞中提取得到一种可滤过性的媒介物，并且将其注入其他的禽类体内，这些禽类随后也感染这种疾病。可是这两位研究者并没有将他们最初的发现研究到底，这个问题留给了在纽约 Rockefeller 学院工作的 Peyton Rous，他开始探寻肿瘤病毒学的原理。

1909 年，Rous 开始对出现于雌鸡胸肌的肉瘤进行研究。在最初的试验中，Rous 将准备好的小块肿瘤植入同一品种的其他禽中，成功地进行了肿瘤的传递。随后，作为这个试验的变化形式，他取出一块肉瘤碎片在沙子中进行研磨，并且对所得到的匀浆液进行过滤（图 3.1）。当他把所得到的滤过液注入幼鸡体内，它们也都产生了肿瘤，有的甚至在几周的时间内就产生了肿瘤。他随后发现，诱发产生的肿瘤再次匀浆后，能作为产生感染性的媒介物，当注射到其他幼鸡体内时，能再次产生肉瘤。

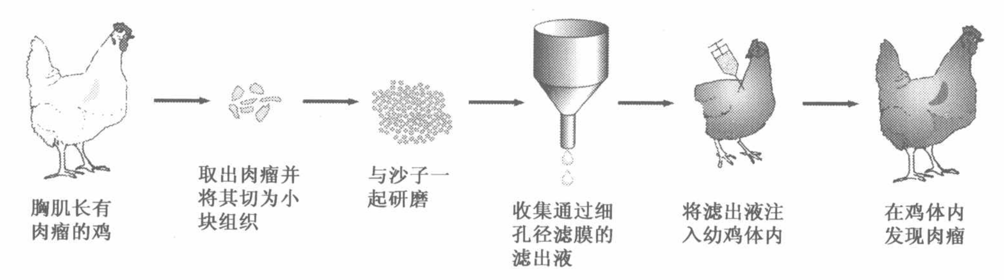


图 3.1　Rous 在鸡中诱导肉瘤发生的流程　Rous 将肉瘤从鸡的胸肌移除，与沙子一起研磨，所得到的组织匀浆液通过细孔径的滤膜过滤。随后将所得到的滤液（透过滤膜的液体）注射入幼鸡的翅膀，几周后能够观察到肉瘤的产生。随后他取出新生的肉瘤，重复上述匀浆、过滤和注射的步骤，在另一只幼鸡体内再次观察到了肿瘤的发生。这些循环能够被无限次地重复；在重复连续几代后，相比最初分离得到的原代病毒，子代病毒引发肉瘤的速度更加迅速。

从诱发肉瘤的介质，从一只动物到另一只的可感染性这些事实中，我们得出了许多结论，这些结论在今天对我们是显而易见的，但在当时却无疑是革命性的。这种致癌性介质显然非常微小，因为它可以通过滤膜。因此，这是一种病毒（见信息栏 3.1）。这种病毒能够注射到鸡体内引发肉瘤，并且具有时间顺序性。这种容易引发感染的介质也给研究者提供了独一无二的机会，使他们能够按照意愿来诱发癌症，而不是依赖于等待肿瘤在动物或者人体自发和不可预知情况下出现。除诱发癌症的能力外，这种被称为

Rous 肉瘤病毒（RSV）的媒介物能够在鸡的组织内进行增殖：在被感染而产生的肿瘤组织中能够发现比最初注射量多得多的病毒。

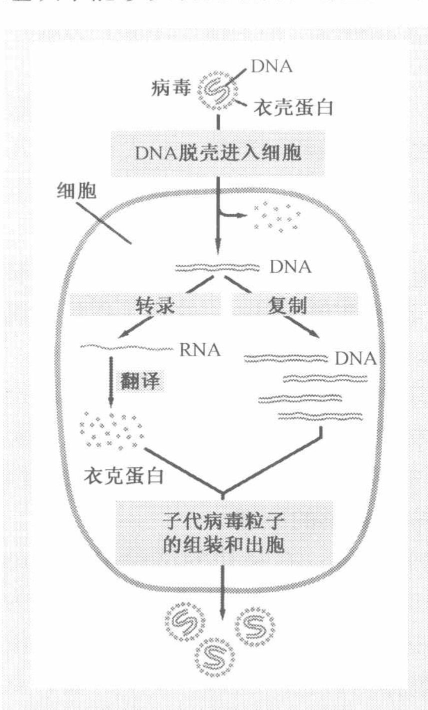


图 3.2　dsDNA 基因组病毒的生命周期　双链 DNA（dsDNA）基因组病毒的生命周期与宿主细胞非常相似。几乎所有合成步骤都会导致病毒 DNA 和 RNA 的合成，而蛋白质则能够运用宿主细胞的合成系统来获得。（From B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002）

信息栏 3.1　病毒具有简单的生命周期　“病毒”这个术语涉及不同系列的传染性颗粒，它们能够感染多种细胞并在其中增殖，宿主范围从细菌到植物和多细胞动物的细胞。相比于它们所感染的细胞，病毒个体是非常细小的，通常被称为**病毒颗粒**。病毒颗粒的结构很简单，在蛋白质外衣（**衣壳**）下包裹着核酸（DNA 或 RNA），有时在其衣壳外还围绕着一层脂膜。在被隔离时，病毒的新陈代谢很迟缓。它们只能通过感染和寄生于合适的宿主细胞来实现增殖。病毒基因组一旦进入宿主细胞，就能够为子代病毒颗粒的合成提供指令。宿主细胞为病毒蛋白质和核酸的合成提供低分子质量前体、蛋白质合成的成套系统以及病毒基因组负责复制和转化所需的聚合酶。

感染周期的终点是数百甚至数千个后代病毒颗粒的产生，它们随后离开感染的细胞并且继续传染其他易感细胞。病毒与宿主之间的相互作用有两种形式：一种是**致命性**的，宿主细胞在感染周期中被破坏；另一种是**温和型**的，宿主细胞能够存活很长时间，并且始终包含病毒基因组和释放子代病毒颗粒。

很多双链 DNA（dsDNA）病毒的复制方式与宿主细胞的大分子 DNA 非常相似（图 3.2）。这使得它们能够利用宿主细胞的 DNA 聚合酶来复制 DNA，利用宿主细胞的 RNA 聚合酶进而以双链 DNA 为模板转录病毒 mRNA，并且利用宿主的核糖体来翻译病毒 mRNA。病毒蛋白质一旦被合成，就用于覆盖（**壳体化**）新合成的病毒基因组，导致完整病毒颗粒的组装，这些颗粒随后从被感染细胞中释放出来。

由于宿主细胞不能表达 RNA 复制相关的酶，含有 RNA 的病毒粒子通常通过编码自己的 RNA 聚合酶来达到复制基因组的目的。脊髓灰质炎病毒和狂犬病病毒都能够生产这类酶。本章后面将要提及的 Rous 肉瘤病毒等 RNA 肿瘤病毒则通过一种较为迂回的路径完成病毒 RNA 的复制。

在 1911 年，当 Rous 终于发表了他的工作，而另外一个关于传染性兔黏液瘤病毒的报道也同时出现。此后不久，Rous 和他的同伴就发现了另外两种鸡肉瘤病毒，而另外一种鸡肉瘤病毒也在日本发现。接下来，经历了 20 余年的沉寂后，新的肿瘤病毒才又被发现。在 Rous 的最初发现半个世纪后，病毒的分子特性和它们增殖的方式仍然是个谜。

然而，他对肉瘤病毒的发现增强了那些相信所有人类疾病都是由传染性介质引发的人的信念。在他们眼中，癌症能够被添加到病因与特定微生物相关联的不断增长的疾病名单上，如同霍乱、肺结核、狂犬病和白血病等。至 1913 年，Dane Johannes Grib Fibiger 报道称，大鼠胃癌的发生能够上溯到其含有的螺旋杆菌蠕虫。由于这项工作，他获得了 1926 年的诺贝尔奖。该工作直接有力地肯定了癌症是一种传染性疾病的观点，

此观点最初由 Rous 提出。

Fibiger 在获得 1926 年诺贝尔奖的几个月后去世，而他的科学体系开始瓦解。他所描述的胃肿瘤其实根本不是肿瘤，而是组织变异的胃上皮细胞。这些细胞受损伤是由动物所遭受的严重维生素缺乏造成的：它们生活在糖精中，几乎只吃糖棒。对于仍然是小团体的肿瘤研究者来说，Fibiger 的诺贝尔奖变得非常尴尬。他们将 Fibiger 全盘否定，对他的工作和癌症能够由传染性媒介物引起的观点都持怀疑态度。

对肿瘤起源的研究兴趣几乎完全转移到了化学诱发癌变方面。能够致癌的化学物质早在 12 世纪就已经被发现。对 Rous 肉瘤病毒和其他肿瘤病毒的研究则在之后的几十年中衰退，进入休眠时期。

3.2 Rous 肉瘤病毒能够在培养液中转化宿主细胞

对 Rous 肉瘤病毒研究的复兴开始于位于 Pasadena 的加利福尼亚技术学院的 Renoto

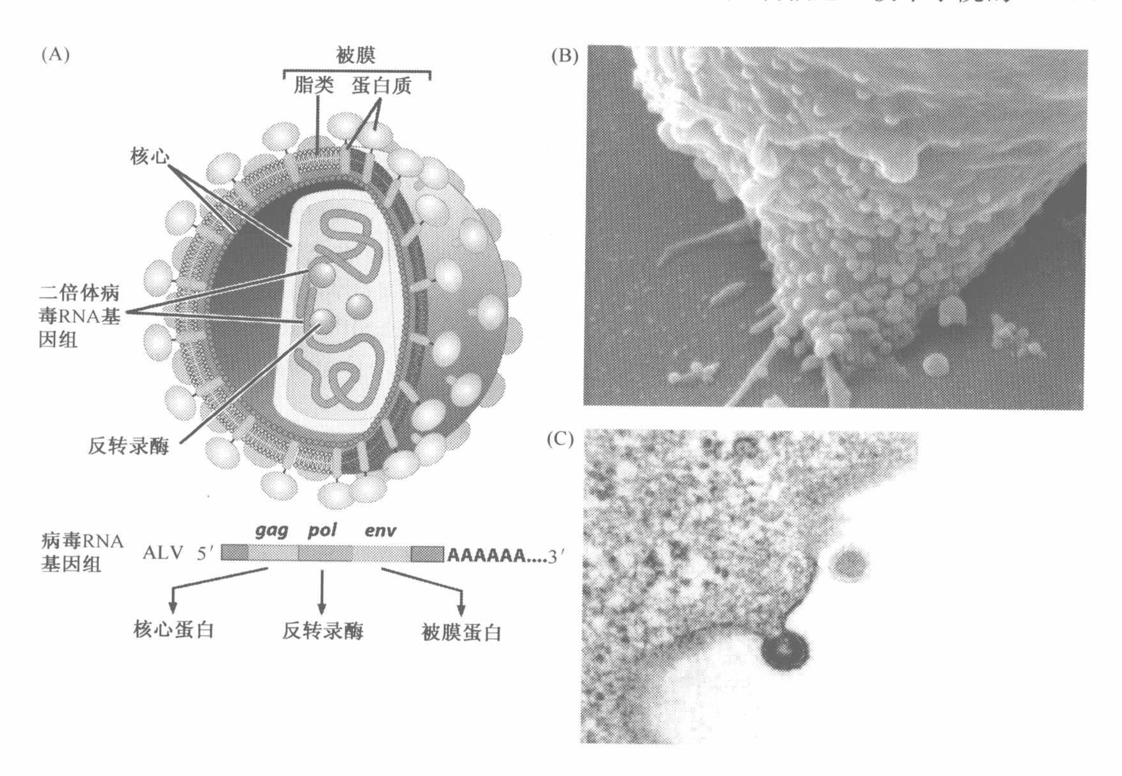


图 3.3 RSV 及相关病毒 (A) 反转录病毒结构示意图，如 RSV 病毒等，包含三种主要的病毒蛋白。糖蛋白突起（由病毒包膜蛋白基因编码）从包裹病毒颗粒的脂双分子层伸出；使病毒颗粒能够吸附于细胞表面，并且将其内含物注入细胞胞质。这些病毒拥有由病毒 *gag* 基因编码的 severn 核心蛋白质构成的复杂蛋白质外衣。在蛋白质外衣内部有两个完全相同的病毒基因组 RNA 拷贝和大量由病毒 *pol* 基因编码的反转录酶分子。电子扫描显微照片（B）和电子透射显微照片（C）显示鼠白血病病毒（MLV）颗粒由被感染细胞的表面出芽。在核壳体（包括 gag 蛋白、病毒 RNA 和反转录酶）离开细胞时，它们利用被感染细胞原生质膜的脂质双分子层碎片来包裹自己。（A, adapted from H. Fan et al., The Biology of AIDS. Boston, MA: Jones and Bartlett Publishers, 1989; B, courtesy of Albert Einstein College of Medicine; C, courtesy of Laboratoire de Biologie Moleculaire.）

Dulbecco 实验室。Dulbecco 的博士后伙伴 HarryRubin 发现，将 RSV 加入培养有鸡胚胎成纤维细胞（CEF）的培养皿时，被 RSV 感染的细胞居然存活了下来，在当时显然是难以究其原因的。RSV 似乎能够在这些细胞中寄生，使它们在几天、几周甚至几个月中稳定地生产子代病毒颗粒（图 3.3）。大多数其他的病毒则相反，它们进入宿主细胞，增殖并迅速杀死宿主；从死亡细胞中释放出的众多子代病毒颗粒能够继续感染附近的其他易感细胞，重复的感染、增殖并破坏细胞。

最重要的是，培养液中被 RSV 感染的细胞表现出很多与癌症细胞相似的性状。当将 RSV 颗粒加入培养皿中鸡纤维原细胞后，出现了由被感染细胞聚集而成的**焦点**（簇）。在显微镜下，这些细胞与从鸡肉瘤中分离得到的细胞非常相似（图 3.4）。这种细胞呈现**圆形**（形态，形状）而其新陈代谢也令人回想起从肿瘤分离出的细胞。这一相似性使 Rubin、Howard Temin（Dulbecco 实验室的一个学生；图 3.5）和其他人总结出细胞**转化**——从正常细胞到肿瘤细胞的转换——的过程能够在培养皿中完成，而不仅是在复杂的难于研究的活组织环境中。

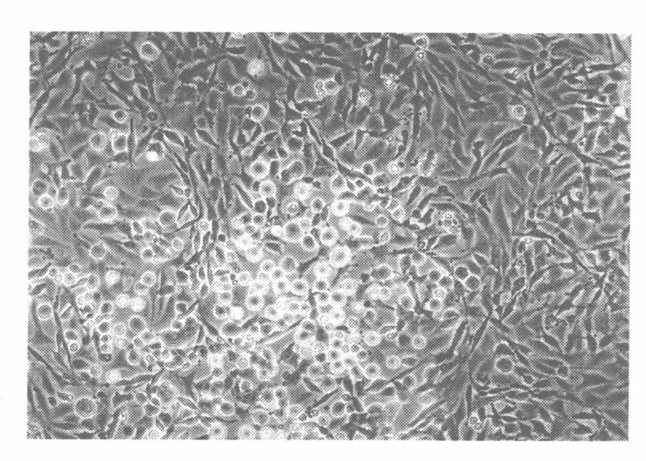


图 3.4 RSV 病毒引发的焦点 相差显微镜显示的是被 Rous 肉瘤病毒转化的鸡胚胎成纤维细胞所形成的焦点，其周围是单层生长的未感染细胞。焦点比较突出是由于它有多层细胞厚，而且与正常细胞的扁平形态相比，被转化细胞的形态呈圆形。（Courtesy of P. K. Vogt.）

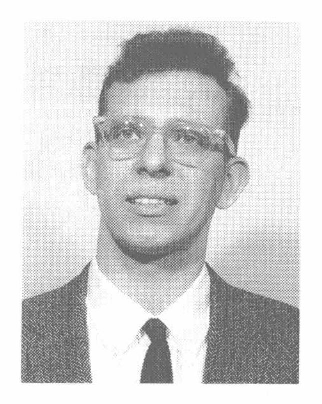


图 3.5 Howard Temin Howard Temin，摄于 1964 年，他的工作从论证 Rous 肉瘤病毒具有在体外引起细胞转化的能力开始，而且证明病毒能够长期存在于被感染和转化的细胞。他推测了 DNA 前病毒的存在，与 David Baltimore 同时发现了反转录酶，并且因此共同分享了 1975 年的诺贝尔医学或生理学奖。（Courtesy of the University of Wisconsin Archives.）

这些简单的观察结果在根本上改变了 20 世纪癌症研究的进程，因为他们清晰地证明肿瘤的形成可以在单个细胞的水平上研究，而单个细胞的行为能够在显微镜下进行密切的跟踪研究。这一发现暗示，肿瘤全部的复杂生物学很有可能能够通过研究由转化细胞形成的肿瘤块来了解。因此，更多的生物学家们开始将癌症视为一类细胞机能失调疾病，而不是非正常发展的组织。

Temin 和 Rubin，以及之后的很多人，都采用这一实验模型来研究细胞转化的一些基本原理。他们对最初被 RSV 感染的细胞的命运感兴趣。与未被感染的邻近细胞相比，这类细胞是如何进行增殖的？当细胞暴露于**病毒颗粒**（virus stock）溶液后，这两位科学家将一层琼胶放置于在培养皿底生长的细胞层上，以此来防止病毒颗粒从最初感染的细胞传播到培养皿上其他未感染的细胞。因此，细胞行为的任何改变都是鸡胚胎成纤维病毒颗粒初始感染的直接结果。

Temin 和 Rubin 所研究的“焦点”显示了普通细胞与转化细胞在行为学上的戏剧性差异。在正常细胞最初引入培养皿时，呈岛状分散在培养皿底部，然后开始增殖直至充满培养皿的底部，形成一层相互汇合的培养物。随后这些正常细胞停止增殖，形成单层细胞，通常被称为一个**细胞单层**（图 3.6）。

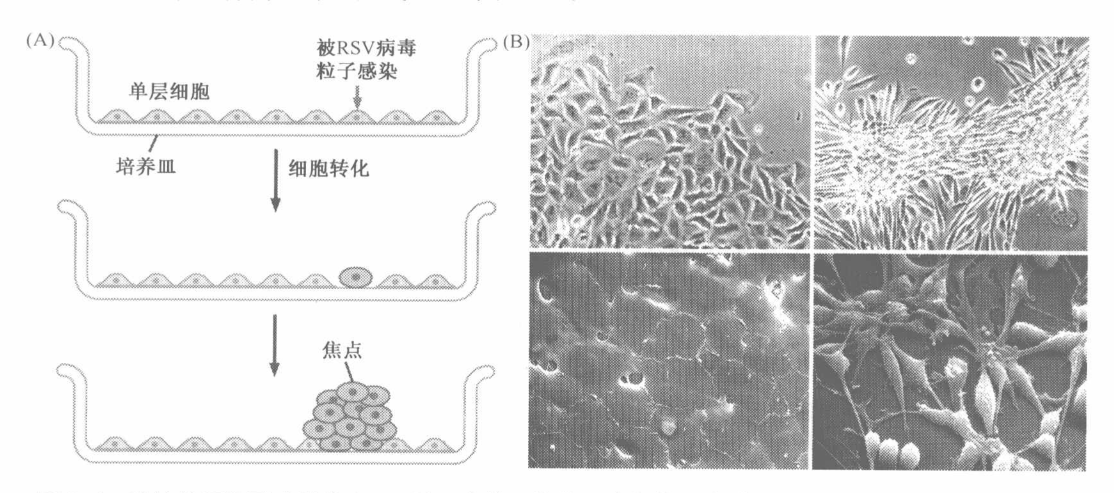


图 3.6　被转化细胞形成的焦点　(A) 生长于培养皿底部的正常鸡胚胎成纤维细胞（蓝色）形成一个细胞厚度层——单层。这是因为，当细胞接触到另一个细胞，它们将停止增殖——“接触抑制”的行为。然而，当细胞被 RSV 病毒感染，该细胞（红色）和其子代细胞将变为圆形并且丧失接触抑制。随后，即使接触到另一个细胞，它们也将继续增殖，最终聚集为一个多细胞厚的细胞簇（焦点），并且能够用肉眼观察到。(B) RSV 感染和转化的影响能够通过相差显微镜（上图）和扫描电子显微镜观察。普通鸡胚胎成纤维细胞展开生长并且形成连续的单细胞层（左图）。然而，随着被 RSV 病毒转化，它们聚集起来，变得能够具有折射性（右上图的白色光圈），并且逐个堆积起来（右图）。(B, courtesy of L. B. Chen.)

这些普通细胞在形成汇合的单细胞层后停止生长，是由一种称为生长抑制、密度抑制或者局部抑制程序作用的结果。不知是何原因，较高的细胞密度或者与临近细胞的接触会引起这些细胞停止分裂。正常细胞的这一行为与被 RSV 感染的转化细胞有极大的不同。后者很明显已经失去接触（密度）抑制并且因此不断增殖，在另一个细胞上堆起并形成多层细胞簇，这些细胞簇厚得常常肉眼就能观察到。

在特定的试验条件下，同一个焦点中的所有细胞都是同一个被 RSV 颗粒感染和转化的原代细胞的后代。现在，我们称这样一群子代细胞为一个细胞克隆，称焦点为一个整体、一个同源的生长群，这说明这些细胞的后代来源于共同的祖先。

RSV 在培养皿中诱发的细胞转化，在包括人类在内的活体动物中引发肿瘤产生，

而培养皿中这些焦点的行为学特征支持了这两者之间相似性的推测：可能在自发产生的人类肿瘤中的所有细胞也构成同源细胞的生长群，并且是一个共同原代细胞的后代，该原代细胞经历转化并且随后启动复制程序，最终得到数百万甚至数十亿子代细胞，它们共同形成块状物。正如之前所讨论的（见 2.5 节），为了检测该观点，从真正确定的角度来说，最终我们需要对人类肿瘤进行详细的遗传学分析。

3.3 保持转化需要 RSV 的持续存在

RSV 诱发的细胞行为学暗示，转化细胞的表型是由最初感染转化的鸡细胞传递给了它的直系后代。这一传递引发了另一系列问题：RSV 病毒颗粒是否感染和转化焦点中的原代细胞，并且随后继续影响所有直系子代细胞的行为，以保证它们能够维持转化？或者，RSV 是否以“后滞作用”的方式起作用，也就是通过打击最初被感染的原代细胞改变其行为，并且随后离开“犯罪现场”？根据第二种方案，原代细胞能够以某种方式将类癌生长的表型传递给它的后代，这个过程不需要 RSV 的持续存在。

Temin 和 Rubin 的工作证明，被 RSV 感染的细胞的后代将继续包含 RSV 基因组的拷贝，但是这仅仅解决了很少一部分问题。真正的问题在于，后代细胞的转化形式实质上是否是由于它们携带的 RSV 基因组所造成的持续影响？

加利福尼亚大学在 1970 年进行的实验明确地解决了这一问题。他们建立了一种 RSV 突变株；在 37℃培养时，能够转化鸡细胞，而于 41℃培养则不能（后者是培养鸡细胞的正常温度）。已知这一类**温度敏感性**（ts）突变株能够编码部分缺陷的蛋白质，这种蛋白质在某一温度下能够维持其正常结构和功能，而在另一温度下则会失去功能，这一功能可能是通过突变异种的蛋白质结构的**热变性**实现的。

在鸡胚胎成纤维细胞被温度敏感性的 RSV 突变体感染后，将被感染细胞置于 37℃（**许可的温度**）培养时，如所预料的一样，细胞发生转化。因此这些细胞能够在低温下

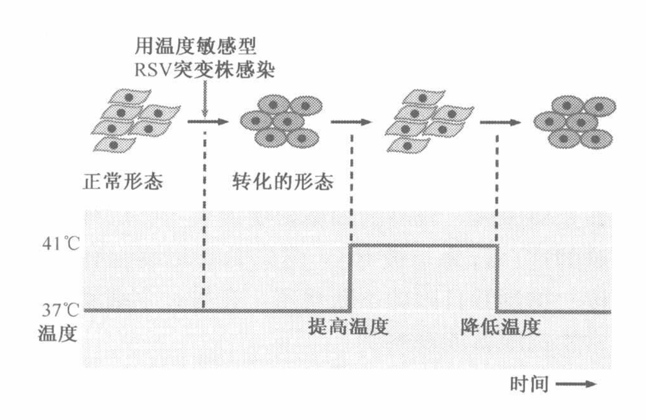


图 3.7 温度敏感性突变株和 RSV 诱发转化的维持 在合适的温度（37℃）下，病毒具有转化功能，当鸡胚胎成纤维细胞在该温度被感染，细胞将发生转化。当含有这些被感染细胞的培养液被转移至非允许的温度（41℃），病毒转化的功能被灭活，细胞也回复到正常未转化的形态。随后，将培养液的温度重新回调至允许的温度，病毒重新获得转化功能，而细胞也再次展现出被转化的形态。在温度上调时，病毒失去转化的表型，这证明了一些温度敏感性病毒蛋白的存在，是它们持续的活动使病毒保持这种表型。而在温度下调时，转化表型的重新获得表示，即使在高温条件下，病毒基因组始终存在于这些细胞中。

被培养很多代，并像癌症细胞一样不断生长和分化，在形态学上显示了它们转化的特征（见图 3.6）。而几周后，如果将被感染的培养液的温度提高至 41℃（不可转化温度），这些细胞迅速丧失它们的转化形式，并转变为未被 RSV 感染时的细胞生长模式（图 3.7）。

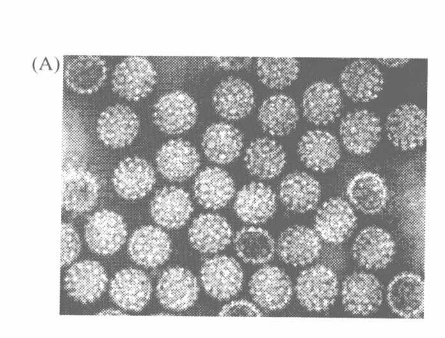
Berkeley 的实验得到了简捷和非常重要的结论。被温度敏感性突变株感染的细胞，其后代继续呈现出温度敏感性的生长轨迹，这说明感染性病毒的基因组的拷贝在最初感染发生后的几周都存在于这些细胞中。在子代细胞中，RSV 基因组的拷贝继续生产一些温度敏感性的蛋白质（具体性质未知）。最重要的是，为了保持被 RSV 感染的细胞的转化生长表型，需要这种蛋白质的持续作用。

这一工作显示，至少，由 RSV 诱发的细胞转化不是一个“打了就跑”的事件。用肿瘤病毒学家的话来说，病毒的转化基因是起始和保持病毒感染细胞转化的表型所需要的。

3.4 包含 DNA 分子的病毒也能够引发肿瘤

RSV 是已发现的能在被感染的动物体内引发肿瘤的病毒中的一种。至 1960 年，另外的四类病毒也同样引起了癌症生物学家的注意。直至 Rous 的先驱性工作 25 年后，一种新型的病毒才被发现。这一病毒是由 Richard Shope 在兔中发现的，它能够在皮肤上引发乳头状瘤。这些损伤都是良性的，只有在很罕见的情况下能够发展为真正的肿瘤——皮肤鳞癌。

至 20 世纪 50 年代末，人们发现 Shope 病毒与 RSV 的构造非常不同。乳头瘤病毒颗粒携带 DNA 基因组，而 RSV 颗粒则携带 RNA 分子。并且，Shope 病毒颗粒由蛋白质外壳包裹，而 RSV 则在外面还有一个很明显的脂质膜壳。在接下来的数十年中，超过 100 种不同的人类乳头瘤病毒（HPV）相继被发现，它们都与 Shope 病毒相关（图 3.8）。



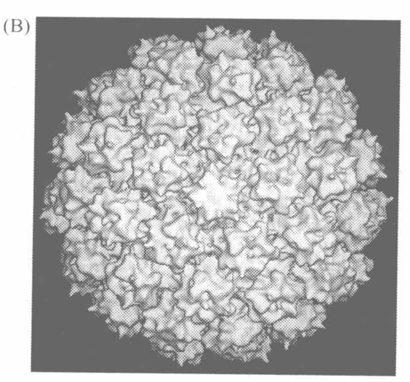


图 3.8 Shope 乳头瘤病毒 (A) Shope 乳头瘤病毒的电镜显微照片。(B) 其低温电镜显微照的放大图，展示了人乳头瘤病毒颗粒的形状。（A, courtesy of D. DiMaio; B, from B. L. Trus et al., Nat. Struct. Biol. 4: 413-420, 1997.）

研究开始于 20 世纪 30 年代缅因州的 Bar Harbor。30 年后，研究者发现了小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV），它能引起某些种属的小鼠中通过母婴传染、乳汁传染的易感性乳腺癌。如同 RSV 的基因组一样，MMTV 基因组由 RNA 分子组成，因此与乳头瘤病毒基因组完全不同。

在 20 世纪五六十年代，人们又发现了多种 DNA 肿瘤病毒（表 3.1）。多瘤病毒于 1953 年被发现，该病毒因其能够在小鼠中诱发多种不同类型的肿瘤而命名。在大小和化学组成上与多瘤病毒最接近的是 SV40 病毒（从一系列分离物中得到的第 40 个猴病毒）。这一病毒最初被认为是 20 世纪 50 年代中晚期生产的脊髓灰质炎病毒疫苗的污染物，后来被证实是猴病毒（图 3.9A）。病毒学的研究发现，SV40 病毒颗粒经常隐藏于恒河猴和短尾猴的肾脏细胞，这些细胞通常被用于在疫苗制备阶段繁殖脊髓灰质炎病毒。实际上，SV40 病毒的存在最初在细胞培养物中并不明显。然而，当利用从这些猴子细胞中繁殖的脊髓灰质炎病毒去感染非洲绿猴的肾脏（AGMIQ 细胞）时，SV40 病毒就表现出了特征性的细胞病变效应——在被感染细胞的细胞浆中产生无数巨大的空泡（由液体充满的类似于气泡的结构）（图 3.9B）。在被 SV40 病毒感染的细胞中形成空泡的一天之内，这一细胞就会溶解，并释放出数万个后代病毒颗粒。（在骨髓灰质炎病毒疫苗的生产过程中，由于 SV40 病毒的污染，一些被骨髓灰质炎病毒感染的细胞能产生比骨髓灰质炎病毒颗粒更多的 SV40 病毒颗粒）！

表 3.1　肿瘤病毒基因组

	病毒家族	基因组近似大小/kb
DNA 病毒		
乙型肝炎病毒	肝炎 DNA（病毒）	3
SV40/多瘤病毒	组病毒	5
人类乳头瘤病毒 16	组病毒	8
人类腺病毒 5	腺病毒	35
人类疱疹病毒 8	疱疹病毒	165
Shope 乳水瘤病毒	痘病毒	160
RNA 病毒		
Rous 肉瘤病毒	反转录病毒	9
人类 T 细胞白血病毒 HILV-1	反转录病毒	9

部分改编自 G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston：Jones and Bartlett Publishers，1995.

SV40 病毒的**溶解周期**与其在小鼠、大鼠和仓鼠胚胎中的行为学有着强烈的对比。SV40 病毒在上述细胞中并不能进行复制，这些细胞由此被认为是非允许宿主。但是偶尔，在被感染的群体中，几千个细胞中可出现一个转化体，拥有很多与 RSV 转化细胞相似的特性，如经历形态学的改变，失去接触抑制，并且获得了在体内引发肿瘤的能力。基于这一点，SV40 被划分为肿瘤病毒。

据估计，在 1955 年到 1963 年使用的脊髓灰质炎菌苗中，包括口服的活塞宾疫苗和灭活的注射用的 salk 疫苗，有 1/3～2/3 被 SV40 病毒污染，并且有 1000 万～3000 万人通过疫苗接触到这一病毒。在 1960 年，恐惧主要源于 SV40 病毒的感染可能在被接种疫苗的人身上引发癌症；而值得的安慰的是，接下来 40 年中的流行病学研究表明，接种过上述两种疫苗的人患癌症的概率仅有很少的提高（信息栏 3.2）。

Shope 的乳头瘤病毒、小鼠的多瘤病毒和 SV40 都归类为 DNA 肿瘤病毒中的**乳多空病毒**，这表明 SV40 病毒在其溶解感染中引发乳头状瘤、多瘤和空泡。至 20 世纪 60 年代中期，研究表明乳多空病毒的基因组都是由双链 DNA 构成（图 3.10）。这为实验

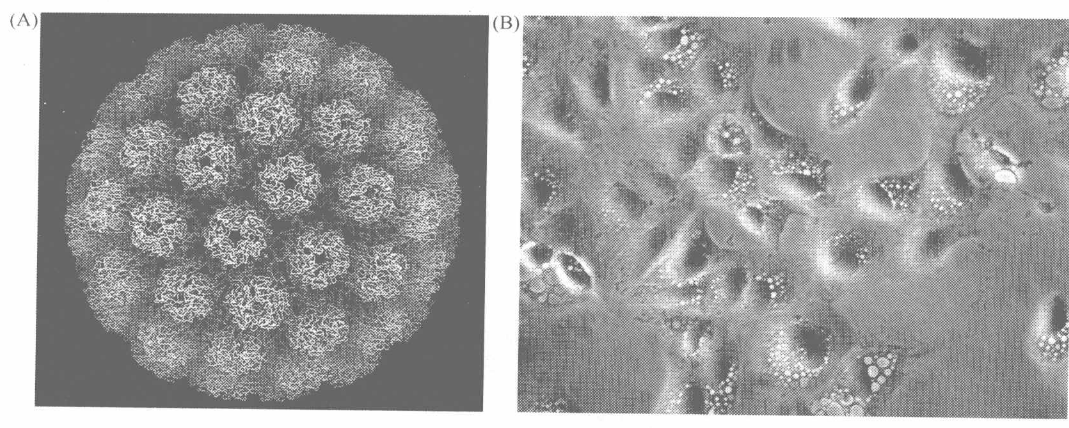


图 3.9 SV40 病毒 （A）X 射线衍射测定结果显示，SV40 DNA 肿瘤病毒的蛋白质衣壳由三种病毒编码的蛋白质构成，这些蛋白质聚集成为五面体和六面体，呈现出二十面体对称型。SV40 的双链 DNA 基因组就存在于衣壳内。（B）SV40 病毒在允许的宿主细胞中，如肾细胞和几种猴子细胞启动溶解周期。由此引发的细胞病变影响很快就能看到，包括在细胞死亡前巨大细胞质空泡的形成和上万个子代病毒颗粒的释放。（A，courtesy of Robert Grant，Stephen Crainic，and James M. Hogle；B，from A. Gordon-Shaag et al. J. Virol. 77:4273-4282，2003.）

者提供了巨大的便利，因为当时已经有几项技术能够将相对较小的环状 DNA 分子(5～8kb）与被感染宿主的细胞染色体中较大的线状 DNA 分子分离开。

信息栏 3.2 SV40 是否引起间皮瘤 间皮是很多内部器官的膜状外层，它由胚胎的中胚层直接分化得到。20 世纪的上半叶，多种间皮表面的肿瘤——间皮瘤在美国仍然不为人所知。从 1960 年开始，它们的发病率逐渐攀升。到 20 世纪末，在美国每年的发病率达到 2500 例。发病率的增长主要归因于石棉，特别是一种称为青石棉的亚型。在工作中接触石棉的人群中经常能够见到该病的患者，该物质通常被用作耐热的绝缘材料，这种材料从 20 世纪 80 年代开始被禁用。然而，有 20%的间皮瘤患者并未发现与石棉有接触，这一事实引发了对其他病原媒介物的探索。

SV40 似乎是间皮瘤合理的病原物。至 2003 年，全世界 41 个实验室报道了间皮瘤细胞中的 SV40 DNA、RNA 和蛋白质。除了特定中脑瘤外，在人类肿瘤中很难发现病毒的踪迹。培养的人类间皮瘤细胞很容易被 SV40 感染，这种感染能够迅速引起此类细胞的**无限增殖化**，使它们无限繁殖。

脊髓灰质炎疫苗中 SV40 污染物的存在，使人们更加怀疑，很多间皮瘤病例是由脊髓灰质炎疫苗的副作用所引起的。实际上，仍然有很多间皮瘤的患者几乎不可能曾经接触过这些疫苗。而且，在 SV40 转化细胞中必然出现的病毒 T 抗原蛋白（见 3.6 节）很难得从间皮瘤中检测到。研究者尝试证明病毒 DNA 含有不常生产的 DNA，他们可以用作实验室人工合成的指示物。例如，用实验室的 SV40 株或经过设计的含有病毒基因组片段的重组 DNA 质粒来污染间皮肿瘤样品，这类污染物的发现为间皮瘤发病机制中 SV40 所发挥作用的怀疑者提供了更多的武器。

有 85%的人类都被两种与 SV40 相关的病毒（JC 和 BK）感染过，而能够识别这些病毒衣壳的抗血清能够与 SV40 衣壳相互作用，解释了为何 SV40 经常存在于人类组织中。在免疫抑制的个体中，特别是 MDS 患者，JC 病毒能够引发致命的脑部病变——进行性多病灶脑白质病（PML），但是没有证据证明它具有致癌性。

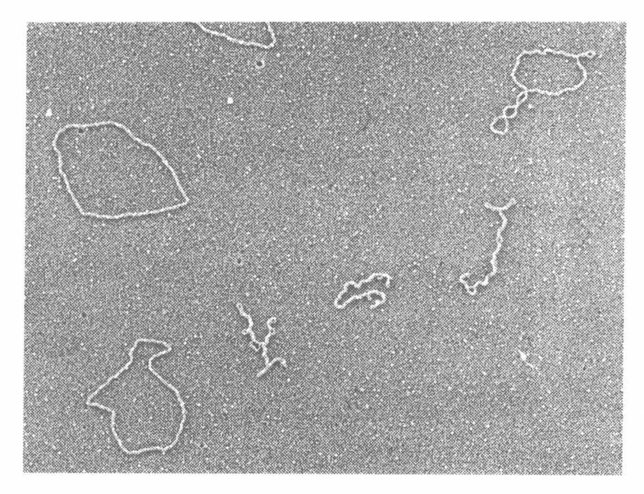


图 3.10 乳多空病毒基因组 电子显微镜的分析显示乳多空病毒 DNA 基因组的结构，包括这里给出的 SV40 病毒基因组的结构是双链环状的。这里展示的是闭环超螺旋形式的 SV40 病毒 DNA（型 I：环形 DNA）和松散而有切刻的环状形式（型 II：开放伸展的环状）。型 III 没有在此展示，它是病毒 DNA 的线状形式，由双链 DNA 断裂产生。(Courtesy of J. D. Griffith.)

人类腺病毒的发现进一步壮大了 DNA 肿瘤病毒的队伍，该病毒能够引发人类的上呼吸道感染，并且能够在被感染的仓鼠身上引发肿瘤。这与 SV40 的行为有着惊人的相似性。两种病毒都能够在他们自然界的宿主细胞中自由的增殖，这些宿主细胞由此被认为是允许的。在随后的病毒的溶解周期中，被允许的宿主细胞在释放出后代的病毒颗粒后被迅速杀死。但是当被引入到非允许的宿主细胞后，腺病毒和 SV40 病毒都停止复制，并且以极低的概率留下转化子的克隆。

其他被列为 DNA 肿瘤病毒的都属于疱疹病毒属。尽管人类 1 型和 2 型疱疹病毒都显然没有**致瘤性**（能够引发肿瘤），但当将一种远缘的 Sairnire 猴疱疹病毒从其他的物种注射入猴子时，能够引起急性致命的淋巴癌。另一种远缘相关的疱疹病毒——Epstein-Barr 病毒（EBV）是在赤道非洲和新几内亚引发小儿 Burkitt 淋巴瘤的元凶，同时也是南亚鼻咽癌的主要成因。最终，痘病毒纲中的至少两个成员，其中包括天花病毒，被发现具有致瘤性：Shope 乳水瘤病毒和 Yaba 猴病毒能够分别在兔子和恒河猴的皮肤造成温和的损伤。至今我们对这些通常具有很大的基因组（135～160kb）的病毒致瘤能力仍然知之甚少。

研究者发现，腺病毒和疱疹病毒颗粒含有长的线性双链 DNA（dsDNA）分子，与 RSV 病毒的基因组相似，它们都携带了病毒复制和诱发细胞转化所需的信息。与乳多空病毒相比，疱疹病毒具有庞大的基因组（表 3.1），提示它们携带有相应的数量巨大的基因。最终，由于乳多空病毒具有相对较小的基因组使其成为癌症分子起源研究的热点。

乳多空病毒基因组中的绝大多数小基因群都显然与其复制有关；其中有一些基因专门编码病毒颗粒衣壳的蛋白。这说明乳多空病毒只能将其少部分基因用于细胞的转化。

以上的研究为极大简化癌症问题提供了很好的前景，使我们能够将研究那些发挥作用的基因和诱发机制的数量降低至非常少。没有这样的简化，癌症学家就只能被迫去研究由非病毒机制诱发转化的细胞的基因组中所存在的引发癌症的基因。细胞基因组含有很大数量的基因，可能超过 10 万个。在当时，分析如此复杂的基因组和将单个的基因从基因组中分离出来是遥不可及的。

3.5 肿瘤病毒诱发细胞表型的多种变化，包括获得致瘤性

如RSV转化的细胞一样，由SV40病毒转化的细胞也表现出巨大的形态学改变和堆积生长。生长抑制的消失只是病毒转化细胞众多改变中的一方面（表3.2）。在本书的后文中将提到，正常的细胞在没有血清和相关生长因子刺激存在的培养液中是不能增殖的。而被多种肿瘤病毒转化的细胞却极大地降低了对培养液中各种因子的需求。

表3.2 转化细胞的特征

形态改变（呈圆形，相差显微镜下有折射）
失去接触抑制（能够重叠交互生长）
不需要固相支持物的支持就能生长（不依赖于支持物）
不受控制的持续增长（永生化）
对生长刺激因子的依赖减少
高饱和密度（能在培养基中形成大量细胞）
除去生长因子刺激后也不能停止其生长
有关葡萄糖的运输活动增加
具有致瘤性

部分改编自 S.J. Flint, L.W. Enquist, R.M. Krug et al., Principles of Virology. Washington DC: ASM Press. 2000,

转化状态的另外一个标志则是在培养液中与正常细胞相比能够增殖更长的时间。研究者发现正常的细胞在培养液中仅有有限的增殖潜力，在经过一定的、预设的分裂后将最终停止增殖。癌症细胞似乎能够在培养液中无限增殖，并因此被描述为能够永生的（见第10章）。当转化的细胞悬浮于琼胶中，这些细胞能够增殖为球状的克隆，每个克隆包含许多甚至上千个细胞（图3.11）。这种不依靠与培养皿提供的固体底物接触而增殖的能力被称为**非接触依赖**。相比较，正常细胞的生长则完全依赖于与固体底物的圈合，并因此被称为**接触依赖**。细胞能够在体外以非接触依赖的形式生长，通常预示着当将其注射入适当的宿主动物时，能够在其体内产生肿瘤。

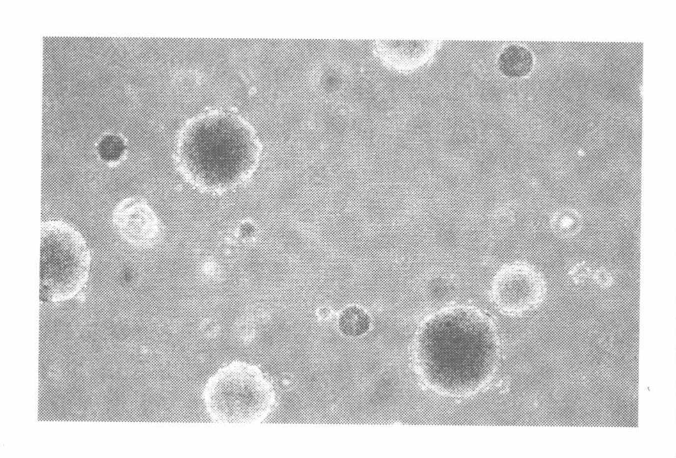


图3.11 不依赖于贴壁的生长 以不依赖于贴壁形式生长得到的克隆的显微照片（视野中每个较大的克隆都包含有几百个细胞）。实验中通常将细胞悬浮于半固体培养基，如琼脂糖或者甲基纤维素等。通过保持这些细胞悬浮状态，这些媒介能够确保细胞不与固体基质接触，特别是培养皿的底面。细胞在悬浮状态下仍然能够增殖的能力，即不依赖与贴壁生长的能力，通常（不是绝对可靠）很好地预示该类病毒在体内能够形成肿瘤。(Courtesy of A. Orimo)

这一形成肿瘤的能力——致瘤性，体现了细胞在极端环境测试中是否完全转化，也就是是否获得了肿瘤的全部特征。

致瘤性的检测可以通过从一种小鼠制备获得用于体外转化试验的细胞，随后将其注入同种其他老鼠体内（信息栏3.3）来观察进行。由于宿主和注射细胞来自于同一个遗传品系，这种**同系基因型**宿主小鼠的免疫系统不能将转化细胞识别为异体，因此就不会

试图消灭它们——**肿瘤排斥**反应的过程（见第 15 章）。这使得注射的细胞能够在它们的宿主动物内存活，同时如果它们确实获得了致瘤性的表现型，就能够增殖为大的肿瘤块。

信息栏 3.3　免疫系统的强弱反映转化细胞是否能够引发肿瘤　在 20 世纪，通过多次近亲繁殖获得了大量不同种的小鼠和大鼠。因为是通过近亲繁殖获得的，繁殖系中每个小鼠在遗传上都是相同的（除了由 Y 染色体引起的性别上的不同）。这类小鼠系包括 BALB/c、C3H 和 C57/Bl6 系。在同一系中，所有个体在遗传上的一致性表示中一只动物的组织片段（包括肿瘤）能够移植到同系的另一动物中，并且可以在受体动物中稳定生长。

远亲繁殖的后代不存在单体间移植组织的能力。除了罕见的相同的双胞胎，如果将组织由一只动物（或者人类）引入另外一只，容纳方的免疫系统将会迅速将其作为外来者识别出来。随后，免疫系统开始着手清除外源组织，通常能够快速取得成功。这表示，体外转化小鼠细胞的致瘤性的准确检测只有在下述情况下才能达到，那就是转化前的细胞与被引入的宿主细胞来源于同系小鼠。近亲繁殖系鸡的缺乏严重限制了利用禽类能够进行的肿瘤研究的类型。

移植的障碍能够通过几种途径来避开。通常，相比于成年动物更强壮、发育良好的免疫系统来说，年轻动物的免疫系统更容易接受遗传上外源性的组织。这使 Rous 实现了他的一些实验。更普遍和实用的却是免疫缺陷型小鼠，它缺乏所有免疫系统的功能并且因此能够容纳植入的外源有机体，包括其他物种的细胞和组织（称为**异种移植物**）。经常使用的免疫妥协小鼠，包括裸鼠、RAG 和 NOD/SCID 小鼠，它们免疫系统各自缺乏一个或者多个重要组分。

通常，肿瘤病毒感染细胞的致瘤性不能在同系基因型宿主动物中被检测，这仅仅是因为在被研究的癌细胞来源的物种中，近亲繁殖的同系基因型宿主细胞是不可得到的。这就要求**免疫耐受**宿主的应用，它们的免疫系统能够耐受很广泛的外来细胞类型，包括那些来自其他物种的（信息栏 3.3）。因此，裸鼠马上就成为检测一系列细胞（包括人源性）致瘤性的最普遍应用的宿主。

最常见的是，将候选的肿瘤细胞对裸鼠进行直接**皮下注射**，如直接注入这些动物的皮下。因为裸鼠还缺乏长毛的能力，它的另一个优点就是使得实验者能够密切观察植入的肿瘤细胞的进展（图 3.12）。

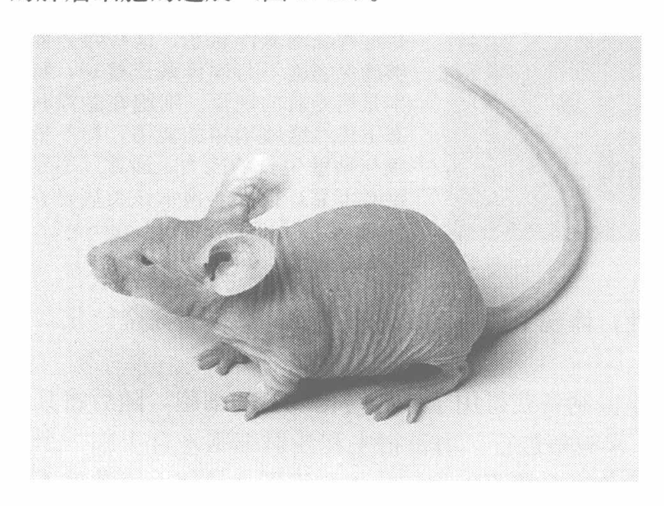


图 3.12　裸鼠　硕鼠在检测致瘤性方面具有两项优势。由于它们是高度免疫耐受的，因此相对而言更容易接纳遗传上没有相关性的植入细胞。此外，由于这类小鼠是无毛的，在皮下注入感染性细胞后更容易监测肿瘤形成的过程。（Courtesy of Harlan Sprague Dawley.）

正如所提到的，RNA 肿瘤病毒（如 RSV）和乳多空病毒较小的基因组，它们都只用少量的基因（或许仅用一个基因）来引起被感染和转化的细胞发生多种改变。一个基因能够在细胞内相伴引发一系列改变的能力被称为基因多效性。相应的，尽管我们手中没有多少关于基因数量的直接证据，但极有可能的是，肿瘤病毒中引发细胞转化的基因能够多效地作用于细胞中的各种分子靶点。

3.6 肿瘤病毒的基因组通过成为宿主细胞 DNA 的一部分而留在病毒转化细胞内

Berkeley 试验（3.3 节）提供了有力的证据证明，保持细胞的转化状态需要 RSV 基因组的持续作用，包括那些被从最初感染的原代细胞中移除的细胞。这表示，某些或者全部的病毒遗传信息需要以某种方式保留下来，从一个转化的母代细胞传给它的两个子代细胞，并且进一步通过许多次细胞生长和分裂的周期继续传给后代细胞。相反的，如果这些病毒基因没有传递给后代细胞将导致细胞逆转回到表现正常生长行为的细胞。

与 RSV 的行为相似，两种被集中研究的 DNA 肿瘤病毒——SV40 和乳多空病毒所引起的细胞转化，似乎也依赖于病毒基因组在原代转化细胞的后代细胞中持续存在。可通过间接的方式来证明这一点，而这些证据大多来自于肿瘤相关蛋白质（T 抗原）的发现，该蛋白质发现于上述两种病毒引发的肿瘤。例如，从携带 SV40 引发肿瘤的小鼠制备的血清，其表现出与核蛋白强烈的免疫反应性，这一核蛋白是 SV40 引发肿瘤的标志物，在多瘤病毒或者其他致瘤试剂引发的肿瘤中并不存在。这表示肿瘤细胞中残留的病毒基因组能够编码一种蛋白质（如 SV40 T 抗原），该蛋白质能够在种植有肿瘤的小鼠或大鼠宿主中引发强烈的免疫反应（图 3.13）。

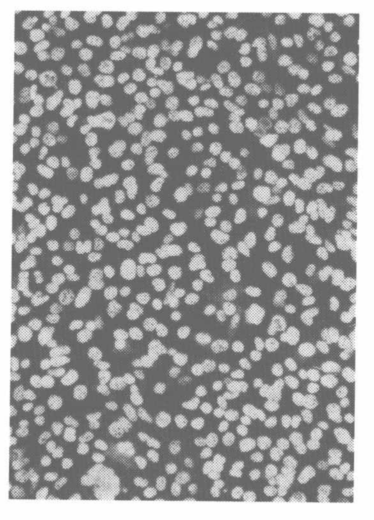


图 3.13 SV40 病毒 T 抗原的表达 当 SV40 转化的细胞被引入同系基因型宿主，能够引发强烈的免疫应答来抵抗 SV40 编码的 T 抗原（肿瘤抗原），该抗原通常被称为“大 T”（LT）。将抗 LT 血清接上合适的免疫荧光蛋白标签，能够对病毒转化的细胞染色，显示出大 T 的核定位。这里所展示的是上述方法的另一版本，利用抗 LT 的单克隆抗体（而不是抗肿瘤血清）对 SV40 转化的小鼠细胞进行染色。(Courtesy of S. S. Tevethia.)

病毒引发的 T 抗原的出现与细胞的转化状态直接相关。因此，当细胞中的 T 抗原消失，其由病毒引发的转化的表型也将同时消失。这种相关性表明，引起细胞转化的病毒序列与编码 T 抗原的病毒序列相关或者紧密相连，但这一点还没有被证实。

在经过许多代细胞，病毒基因组从细胞到细胞的传递揭示了一个重要的概念问题。细胞基因在从母代细胞到子代细胞的传递过程中几乎完全保真，通过认真执行的染色体DNA复制程序和细胞生长分裂周期中的有丝分裂程序。病毒基因组是如何成功地在无限数量的细胞代中有效的复制和传递？这一点尤其令人迷惑，因为病毒基因组似乎缺少在有丝分裂中将染色体适当的分配给子代细胞所需要的遗传元素。

乳多空病毒，如SV40病毒和多瘤病毒，它们DNA的新陈代谢与其宿主细胞非常不同。当SV40病毒和多瘤病毒感染允许的宿主细胞，病毒DNA将作为自发的染色体外的分子进行复制。这两种病毒都能够从最初感染引入的单个病毒DNA基因组形成上万个大约5kb的环状双链DNA分子（见图3.10）。尽管病毒DNA的复制需要利用大量宿主细胞的DNA复制酶，但是它的复制过程并不依赖于被感染细胞的染色体DNA的复制。这种发生在SV40病毒和多瘤病毒的溶解周期的非染色体复制，不能够解释这些病毒的基因组是如何在病毒转化细胞中保全的。毕竟后者是不允许的，并且阻止这些病毒复制它们的DNA。

这一难题的答案于1968年被解开，研究发现SV40转化细胞中的病毒DNA与染色体DNA紧密联系。利用离心技术来精确计量DNA分子的分子质量，人们发现这些细胞中的SV40病毒DNA不再如较小的病毒DNA基因组（约5kb）那样沉降。取而代之，在病毒转化细胞中的SV40病毒DNA序列与宿主细胞中较大分子质量的染色体DNA共同沉降下来（图3.14）。实际上，即使使用最严酷的方法也不能将转化细胞中的病毒DNA从细胞染色体DNA中分离出来，即便是将其暴露于强碱性pH的环境中。

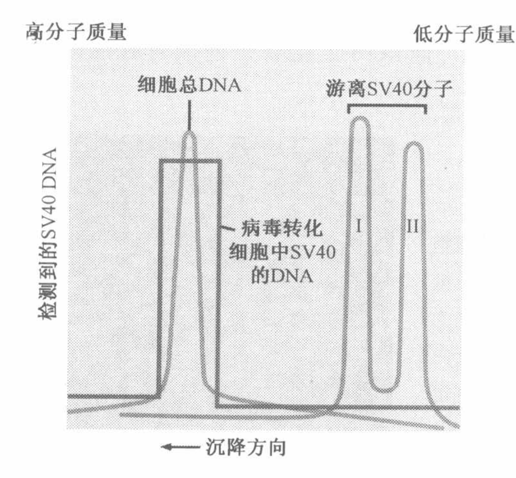


图3.14　SV40病毒DNA的整合　将SV40转化细胞的DNA分子提取后，在用蔗糖梯度（用于防止离心管中不同液体层混合）稳定的碱性溶液中离心沉降。在这些情况下，大分子质量的细胞DNA（蓝色）在蔗糖梯度中沉降一定的距离（图左侧）。相比，病毒颗粒中提取的SV40病毒DNA（绿色）则沉降的比较慢，这预示它的分子质量相对较小。I型和II型病毒DNA分别指的是SV40病毒的闭环和缺刻环状DNA（图3.10）。核酸杂交的应用表明SV40病毒转化细胞中的SV40病毒DNA序列与病毒感染细胞的大分子质量染色体DNA（红色）发生了共沉降。（Adapted from J. Sambrook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60：1288-1295，1968.）

这一结果暗示，在病毒转化细胞中SV40病毒DNA与染色体DNA是共价相连的。病毒基因组的**整合**解决了病毒转化的一个重要问题：病毒DNA序列从母代细胞到子代细胞的传递是能够被保证的，因为病毒DNA能够在细胞周期的S期（DNA合成期）与细胞染色体共同复制。通过与染色体整合，病毒DNA序列有效地成为细胞基因组的一部分，如同细胞自身基因一样。

若干年后，人们发现乳多空病毒能够与宿主细胞基因组整合的能力与一种人类常见

癌症——宫颈癌的发病机制相关。几乎所有的这类肿瘤（>99.7%）都发现有人类乳头瘤病毒基因组整合入染色体 DNA。引起人们兴趣的是，人们几乎从未发现完整的病毒基因组整合存在于肿瘤细胞基因组。相反，只有一部分包含**癌基因**（引发癌症）信息的病毒基因组在这些肿瘤细胞的染色体 DNA 中被发现，而使这些病毒能够复制和构建后代病毒颗粒的部分通常缺失或者仅以碎片的形式存在。

3.7 反转录病毒基因组与被感染细胞的染色体发生整合

SV40 病毒和多瘤病毒能够将它们的基因组与宿主细胞染色体 DNA 整合，这个发现解决了一方面的问题，但是却由此产生了另一个似乎更难解决的问题：RSV 病毒如何在细胞系中成功地将其基因组在如此多的世代中传递下去？RSV 病毒的基因组是由单链 RNA 分子组成（图 3.15），这显然不可能被直接与被感染细胞的染色体 DNA 整合。而 RSV 确实能够成功地将它的遗传信息通过细胞生长和分裂周期传递下去（信息栏 3.4）。

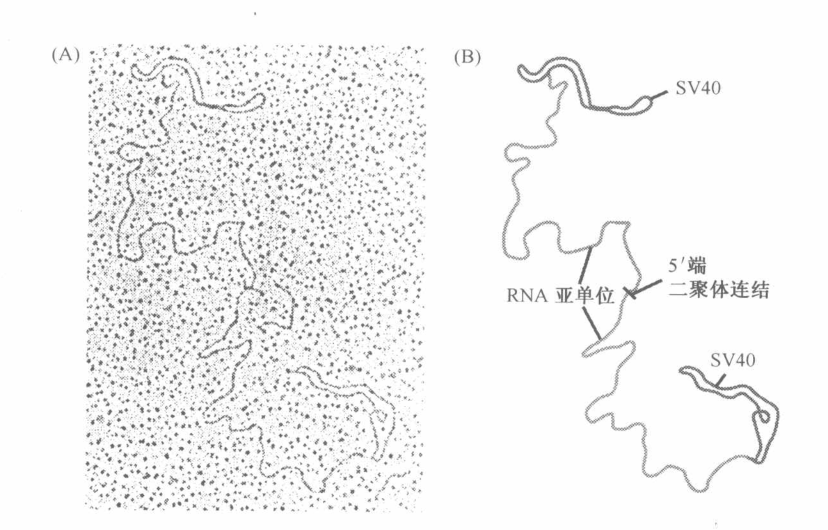


图 3.15 RNA 肿瘤病毒的基因组结构 如 RSV 等病毒携带单链 RNA（ssRNA）基因组。独一无二的是，此类病毒基因组是二倍体形式，如它携带两个完全相同的病毒遗传序列的拷贝。这种基因组的组成是通过电子显微镜揭示的。(A) 电子显微镜显示的是与 RSV 亲缘性较远的被称为“狒狒内源性病毒”的基因组。(B) 正如示意图所显示的，用酶在 SV40 的环状双链 DNA 分子（红色，顶端，底部）添加寡聚胸腺嘧啶尾巴，并用其标记两条单链病毒 RNA 分子（蓝色）的 3′端。病毒 RNA 分子（如同细胞 mRNA 分子）在其 3′端存在 polyA，因此能够与环状 SV40 分子附加的 oligo dT 尾巴退火结合。两条单链 RNA 分子的 5′端相连。(Adapted from W. Bender and N. Davidson, Cell 7：595-607，1976.)

信息栏 3.4 再次感染不能够解释 RSV 基因组的稳定传递 RSV 基因组由最初感染的细胞到子代细胞的传递是能够被解释的，在原则上，病毒感染细胞能够持续释放病毒颗粒，这些颗粒随后会感染子代细胞。再感染的这个重复的周期能够确保 RSV 基因组在一群细胞中存留下来，而不需要病毒遗传信息的染色体整合，如同在 SV40 病毒中的情况（3.6 节）。实际上，使用能够感染和转化细胞但是不能复制的病毒株也能够引发细胞群的稳定转化。此外，还发现一些细胞群能够被最初的 RSV 感染转化，但是却不再出现随后的再感染周期。总而言之，这些观察有力地排除了再感染作为 RSV 在多代细胞的细胞谱系中存留的方法。

在 20 世纪 60 年代中期和后期，这一问题吸引了 Temin，并且使他设计了一个令很多人嘲笑的异类的解决方法，这一方法使他降落在科学的荒漠上。Temin 称在 RSV 颗粒（以及其他相关病毒）感染细胞后，立即建立起 RNA 基因组的双链 DNA 拷贝。也正是这些病毒基因组的双链 DNA 形式被固定于宿主细胞的染色体 DNA 中。一旦以这种方式固定，病毒基因组的 DNA 形式——**前病毒**就承担起细胞基因的分子构型，并且每次细胞复制其染色体 DNA 时都能够被同时复制。另外，前病毒 DNA 一旦在基因组中固定，可以用作细胞 RNA 聚合酶转录的模板，由此产生能够组装入子代病毒颗粒的 RNA 分子，或者行使信使 RNA（mRNA）的职责，用于合成病毒蛋白（图 3.16）。

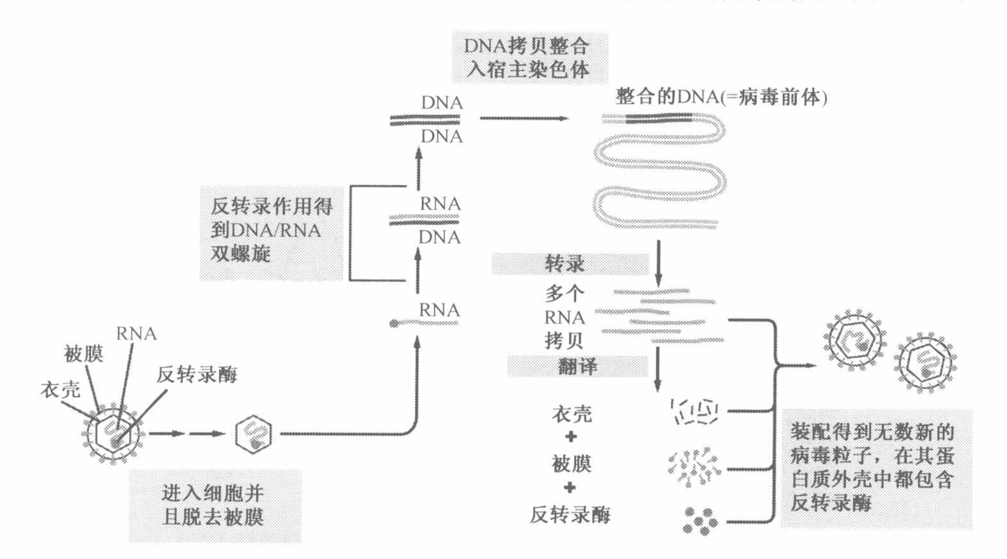


图 3.16 RSV 等 RNA 肿瘤病毒的生命周期 反转录病毒的复制周期的大体轮廓由 Temin 提出；随后其分子上的细节被揭开，如这里展示的一样。具有感染性的病毒将它的单链 RNA 基因组（蓝色）与反转录酶（RT）一起引入细胞的胞质，在 RT 的作用下，以病毒 RNA 为模板，反转录出了双链 DNA（ds）拷贝，此反转录 DNA 则入核并在此与细胞染色体 DNA（橙色）发生整合。整合的前病毒利用宿主的 RNA 聚合酶 II（polII）转录成为单链 RNA 分子（蓝色）。子代 RNA 分子被输出进入细胞质，并作为 mRNA 来制造病毒蛋白或者包装成为子代病毒颗粒，离开细胞并且开始新一次的感染。（From B. Alberts et al.，Essential Cell Biology，2nd ed. New York：Garland Science，2004.）

Temin 提出的**反转录**的过程——建立 RNA 分子的 DNA 拷贝，在当时没有分子生物学的先例，当时的观点认为信息是以 DNA-RNA-蛋白质的形式单向传递。但是这一

观点最终获胜了，Temin 和 David Baltimore 在 1970 年同时发现了 RSV 和相关病毒颗粒携带有反转录酶，强有力地证明了这个观点。正如这两支研究队伍所发现的，这种酶有执行 Temin 预测的这个关键复制步骤的能力，使 RSV 能够通过很多个细胞生长和分裂周期传递它的基因组。

很快，人们发现 RSV 病毒只是一大类具有相同结构的病毒中的一个，这类病毒被称为**“反转录病毒”**，以此来反映在它们的复制周期中，信息是由 RNA 分子反向流回 DNA。在反转录酶发现后的一年中，人们在 RSV 感染细胞的染色体 DNA 中发现了前病毒 DNA 的存在。因此，如同 SV40 和多瘤病毒那样，反转录病毒通过将基因组整合入染色体以保证它们基因组的稳定保留和传递。

然而，RSV 等反转录病毒与 SV40 和多瘤病毒等 DNA 肿瘤病毒的整合机制有很明显的不同。整合是反转录病毒复制周期中很正常和必要的部分。但是，对于 DNA 肿瘤病毒，其基因组染色体整合是非常罕有的事件（≪1/1000），这使得病毒的基因组持久保留在最初感染细胞的后代中；还有一种少见的例子，SV40 的基因组以一种偶然的形式成功地整合入染色体 DNA，并且通常仅含有野生型基因组的碎片（图 3.17）。

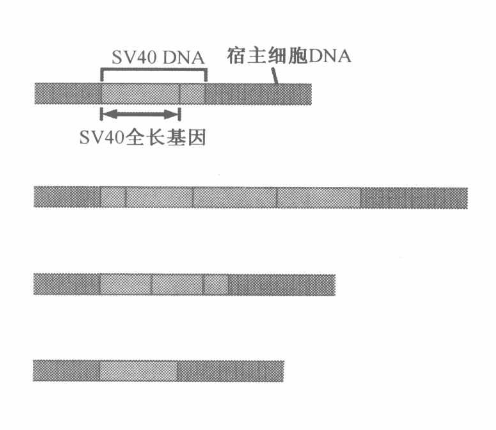


图 3.17　整合的 SV40 基因组的结构　应用限制酶切割位点图谱，可了解与病毒转化细胞的染色体 DNA 发生整合的 SV40 基因组的结构。在一些细胞中，仅存在病毒基因组的一部分；而在其他细胞中，则存在大量首尾相串联的排列。整合的事件包括环状 SV40 病毒 DNA 的线性化和病毒 DNA 与染色体 DNA 间的随机非同源性重组。重组事件中，两条 DNA 链上都不包含特定的位点。所有整合基因组仅有一项共有的特征，就是 SV40 基因组中存在的“早期区域”，该基因编码病毒转化蛋白，特别是大 T 和小 T 抗原。这里展示的是 SV40 病毒 DNA 与细胞染色体 DNA 整合的四个实例。（Adapted from M. Botchan，W. Topp，and J. Sambrook，Cell 9：269-287，1976.）

3.8　RSV 病毒所携带的 *src* 基因也同样存在于未被感染的细胞中

由于乳多空病毒等反转录病毒的基因组非常小（<10kb），反转录病毒基因组的编码能力似乎局限于少数的基因，甚至可能少于 10 个。依赖这一小部分的基因，反转录病毒仍然成功地翻译一些复制所需的病毒蛋白，以及构建和装配后代病毒颗粒和转化被感染细胞所需的其他蛋白质。

对于 RSV 而言，病毒突变株的应用揭示出病毒的复制功能（包括反转录和后代病毒颗粒的建立）需要一系列的基因，而病毒转化功能则需要另外一系列基因。因此，一些 I/SV 病毒突变株能够在被感染细胞中很好的复制，产生大量的后代病毒颗粒，但这种突变株缺乏转化的功能。相反，其他由 RSV 衍化出的能够转化细胞的突变株却失去了在转化细胞中复制和产生后代病毒颗粒的能力。

至少有三种反转录病毒的基因涉及病毒的复制。其中两种编码病毒颗粒装配所需的结构蛋白质；第三种则编码反转录（RT）酶，在反转录病毒进入宿主细胞后，该酶将病毒RNA逆转录为DNA。RSV病毒的RNA基因组与失去转化能力的相关反转录病毒的基因组相比显示，仅有非常少量的RSV病毒基因组致力于编码已知的病毒功能——转化。由此，研究RSV病毒的遗传学家推测，所有病毒的转化功能体现在一个基因，该基因被称为*src*（读作sark），代表其在被感染的鸡体内形成肉瘤的作用（图3.18）。

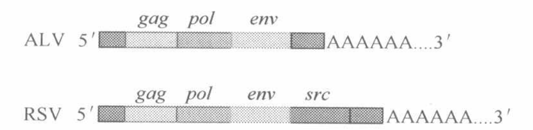
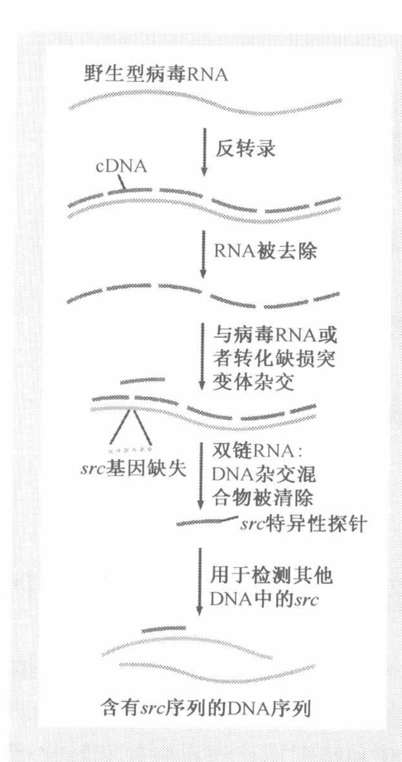


图3.18 Rous肉瘤病毒基因组的结构 RSV病毒的RNA基因组与一种相对常见的禽白血病病毒（ALV）关系紧密。注明了ALV基因组编码的gag蛋白能够与病毒RNA一起构成这些颗粒的核蛋白核心（见图3.4）；编码反转录酶的*pol*基因和指定病毒糖蛋白突起的*env*基因。此外，RSV基因组携带编码Src蛋白的基因（*src*，棕色），该蛋白能够引发细胞转化。在此未提及的是这些RNA分子5′端的特殊帽子结构。



信息栏3.5 *src*特异性DNA探针的制作 为了制作*src*特异性的DNA探针，在Bishop和Varnus的实验室工作的一位研究者开发了两种类型的RSV病毒株：一种是野生型RSV基因组，携带由病毒复制和转化所必需的所有序列；另一种是突变型RSV基因组，能够进行复制，但是由于遗传序列的较大缺失而丢失了转录所需要的*src*序列（图3.19）。利用反转录酶，他制作了野生型序列的DNA拷贝，得到与病毒RNA互补的单链DNA分子。该DNA分子片段化后，与缺乏*src*序列的RSV缺失突变株的RNA基因组进行杂交，得到DNA-RNA杂交分子。他随后将未形成DNA-RNA杂交物的单链DNA分子回收（去除那些形成杂交物的）。得到的单链DNA片段就是能够识别突变型RSV基因组缺失部分所包含的序列，也就是位于*src*基因内的序列。

因为最初野生型RSV病毒RNA的反转录使用了放射标记的脱氧核糖核酸三磷酸，*src*特异性的DNA片段（构成*src*探针）也就被放射性同位素标记。通过检测*src*探针是否能够与细胞DNA杂交，就能够发现感兴趣的基因（如病毒感染或者非感染细胞中得到的DNA）是否携带有*src*序列。

图3.19 *src*特异性DNA探针的构造 野生型（wt）RSV病毒RNA（蓝色）只有在合成单链互补DNA分子（cDNA，红色）时才发生反转录。野生型单链病毒DNA随后与RSV病毒转化缺损（td）突变株的病毒RNA（绿色）退火（杂交），该突变株丧失了转化功能并且显然缺失了*src*基因。所得到的双链RNA：DNA杂交混合物被清除，留下了未与td突变株RNA杂交的wtDNA的单链DNA片段。残存下来的DNA片段，如果用放射标记，可以被用作*src*特异性探针来检测各种细胞DNA（橙色）中的*src*相关基因。

在 1974 年，在加利福尼亚大学，由 J. Michael Bishop 和 Harold-Varmus 共同运作的实验室着手制作 DNA **探针**，该探针能特异性识别 RSV 基因组中与转化相关联的序列（如 *src*），以了解它的起源和功能（见信息栏 3.5）。这种 *src* 特异性的探针随后被用于追踪细胞被 RSV 病毒感染后 *src* 基因的命运。值得注意的是，在未感染的鸡细胞是不会有 *src* 相关 DNA 序列在其基因组内的。而受到感染后，由于传染性病毒基因组的引入，*src* 序列在细胞中将被迅速地检测出来。

这一试验的实际结果却与预期的完全不同。在 1975 年，这个研究小组运用他们的 *src* 特异性探针发现，*src* 序列显然已经存在于未被病毒感染的鸡细胞中。这些 *src* 序列以单拷贝细胞基因形式存在；也就是说每个二倍体鸡细胞基因组中存在两个 *src* 相关 DNA 序列的拷贝——恰恰是细胞基因组中大多数基因的存在形式。

鸡细胞基因组中存在的 *src* 序列不会像杂交过程中用于检测的人工合成物一样消失。此外，这些 *src* 序列的细节上的特点说明其不可能是被反转录病毒反转录入鸡的基因组的。例如，在几种相关的鸟类，甚至在进化树中相距较远的几种哺乳动物的 DNA 中，*src* 相关 DNA 序列都能够明显的被探测到（图 3.20）。与鸡的进化亲缘关系越远的物种，*src* 探针与其 DNA 的反应就越弱。这恰恰是一个细胞自身基因所预期的行为，该基因存在于共同祖先的基因组中，在几百万年的过程中逐渐进化获得日益不同的 DNA 序列，而其后代物种也随着进化彼此逐渐远离。

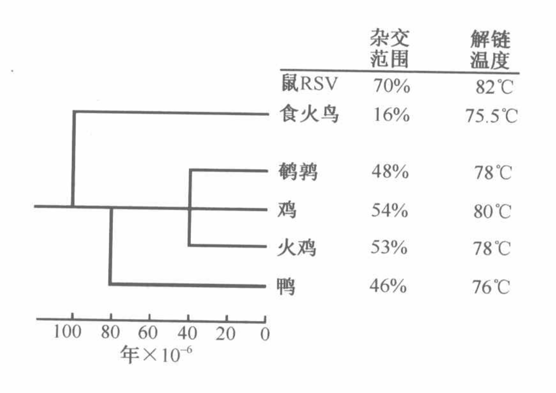


图 3.20 *src* 基因的进化树 *src* 特异性 cDNA 探针（见图 3.20）能够与各种禽类的 DNA 退火。这些禽类与鸡的亲缘关系如进化树中所示——与最近被 RSV 感染和转化的小鼠细胞一样。遥远的进化久远年代，多组物种共有的祖先所生存的时期标识在下方的横坐标中。与 RSV 病毒的 *src* 探针杂交最好的是 RSV 转化的小鼠细胞的 DNA，该 DNA 携带有 RSV 前病毒（作为阳性对照），该结果同时被与细胞 DNA 退火的放射性探针比例和所得杂交产物的解链温度证实（解链温度较高表明两条杂交链的序列互补程度较高）。*src* 探针在较小的区域与鸡 DNA 退火，因此其杂交产物在稍低的温度即可发生变性，这说明 RSV 病毒的 *src* 基因序列与鸡基因组的相关序列略有不同。一些进一步由鸡进化分离的物种的 *src* 原癌基因显示出更少区域的杂交，并且所得到的杂交物能够在更低的温度熔解。随后的工作揭示在其他多细胞动物门的有机体 DNA 中也存在 *src* 序列，如节肢动物，（如果蝇）甚至是海绵，图中未示出。(Courtesy of H. E. Varmus.)

如此多的证据表明，在未被感染的鸡细胞基因组中存在的 *src* 序列，拥有正常细胞基因的所有的性质，在每个单倍体基因组中存在一个单独的拷贝，在几千万年中缓慢的进化，同时也存在于鸟类和哺乳动物共同的祖先脊椎动物中。这一认识使人们对肿瘤起源的思考有了革命性的发展。

3.9　RSV 利用细胞内的基因来诱导转化细胞

在正常有机体的基因组中存在着高度保守的 *src* 基因，暗示这种细胞内 *src* 基因，有时被称为 c-*src*（如细胞 *src*），在这种有机体（鸡）和它的细胞的生命中发挥着某种作用。这种作用是如何被 RSV 基因组携带的转化型 *src* 基因所调停的？这种病毒转化基因（v-*src*）与鸡的 c-*src* 基因密切相关，但是这两种基因存在极为不同的作用和功能。当存在于细胞基因组中时，c-*src* 基因的功能与正常细胞的行为和正常机体的发展相适合。相反，由 RSV 基因组产生的非常相似的 v-*src* 基因，则起到潜在的**癌基因**的作用，能够将普通鸡细胞转化为肿瘤细胞。

是否有可能 RSV 的 *src* 基因并不先天存在于 RSV 祖先反转录病毒的基因组中？人们开始思考这个可能性并期望找到答案。这种假定的病毒祖先，虽然缺失 *src* 序列，却很好能够在鸡细胞中进行复制。实际上，*src* 阴性的反转录病毒禽白血病病毒（ALV）在鸡中很普遍，并且能够从一只鸡传染至另一只（见信息栏 3.6）。这说明在鸡细胞感染的过程中，一个祖先病毒，类似于这种普通鸡病毒，能够通过某些遗传途径从宿主细胞基因组中获得某些序列（图 3.21）。所获得的细胞序列（如 *src* 序列）随后与病毒基因组整合，成为该反转录病毒（如相似的反转录病毒）在被感染细胞中实现复制功能的三个基因后的第四个基因（图 3.18）。一旦存在于 RSV 的基因组中，被捕获的 *src* 基因能够随后被病毒改变和利用以转化被感染的细胞。

信息栏 3.6　像 RSV 等病毒的生命很短暂　间接的证据显示，由禽白血病病毒（ALV）引起的鸡细胞感染能够在 ALV 基因组中引入鸡 c-*src* 基因，产生被称为 RSV 的杂交病毒。这类重组事件在 20 世纪仅发生过一次，所有包含 *src* 的鸡反转录病毒似乎都是 1909 年左右出现于鸡笼的 RSV 病毒的子代。RSV 的发现依赖于一个偶然的情况：纽约长岛的一位鸡农给 Peyton Rous 带来一只珍贵的长肿瘤的母鸡，希望他能够将其治愈。

病毒基因组中获得的 *src* 基因的存在不能给该病毒带来明显的生长便利，而且 RSV 并不能在动物之间进行传播。此外，稍后将描述具有同样配置的反转录病毒，在其基因组中也携带病毒和细胞基因，这类基因在宿主细胞间的传播能力较差，通常是因为缺失了基本的病毒复制基因以容纳来自于细胞的癌基因。出于这些原因，RSV 等杂交反转录病毒似乎是通过在被感染动物体内发生罕见的遗传学重组产生，随后引发肿瘤，并且在动物死亡后消失，除非有警觉的鸡农或者屠夫偶然发现了肿瘤，并将其交给感兴趣的病毒学家。而该病毒学家也可能能够或者不能够成功地从肿瘤中分离得到转化的反转录病毒。

这一策划要归功于反转录病毒能聪明的挑选和应用现成的细胞基因为自己所用。这种行为对于病毒来说是非常不同寻常的，因为实际上其他所有病毒都携带有与其所感染细胞的基因序列具有少许亲缘性的序列（见信息栏 3.7）。

但是，在此还有更重要的一课需要学习，是关于 c-*src* 基因的。上万个鸡细胞基因中的这个细胞基因，被类似于 RSV 病毒的反转录病毒进行一些细微的改造后，即可能被转化为潜在的病毒癌基因。因为它是一种活性癌基因的前体，c-*src* 又被称为**原癌基因**。原癌基因的概念是革命性的：它暗示正常脊椎动物细胞的基因组携带着在特定环境中有潜力诱发细胞转化和肿瘤的基因。

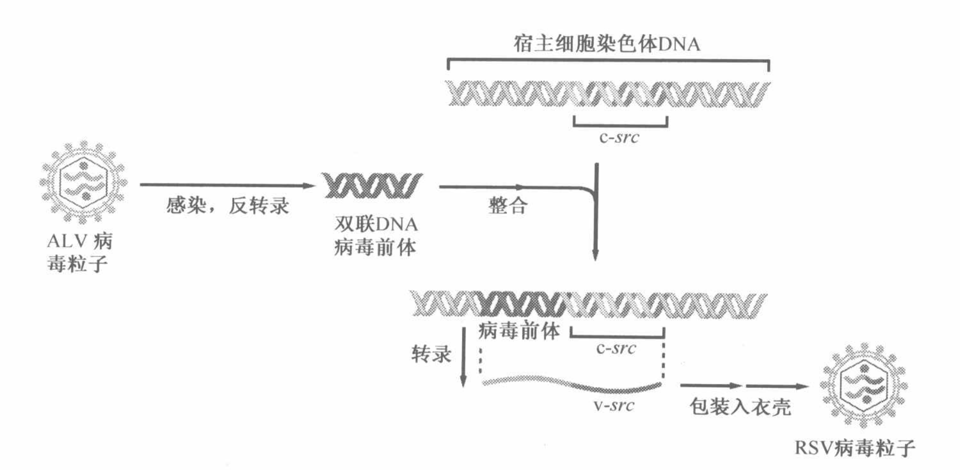


图 3.21　禽白血病病毒获取 *src*　禽白血病病毒获取细胞 *src* 基因（c-*src*）的精确机制还不明确。这里描述一个似乎很有道理的方案。在被感染的鸡细胞中，ALV 前病毒 DNA（红色）偶然整合在 c-*src* 原癌基因（绿色）的旁边。ALV 前病毒和邻近的 c-*src* 基因能够被共同转录为一条杂交 RNA 转录物（蓝色和棕色）。在将 c-*src* 内元（未给出）剪接出后，这个杂交的病毒 RNA 被包装入病毒颗粒，这个病毒颗粒成为 Rous 肉瘤病毒（RSV）的祖先（没有给出的是 ALV 序列在 v-*src* 基因 3′端的结合，结果导致这个病毒癌基因出现于 ALV 序列的两侧）。

信息栏 3.7　病毒和它们的基因起源自哪里？　Varmus 和 Bishop 的实验室关于 RSV 病毒 *src* 基因细胞起源的发现引发了另外一个问题，那就是大多数的病毒基因是从哪里得来的和病毒是如何起源的？在 DNA 和 RNA 病毒的复制周期中，病毒基因组复制的保真性比细胞 DNA 复制的低很多。结果是病毒基因组序列比 metazoan 细胞的基因组序列进化得更快。因此，前体基因序列在其他病毒和细胞存在过的任何痕迹都被上亿年前的这种快速进化抹掉了。

我们可能将永远不会了解绝大多数病毒基因组是从哪里和如何起源的。也许，病毒在其寄生的细胞出现时就已经存在了。一些病毒可能以逃脱的细胞基因开始，它们突然离开细胞基因组自己独立出来。RNA 病毒可能承载着早期细胞生命形式的痕迹，它们可能利用 RNA 分子作为基因组；而如果是反转录病毒，则可能是细胞进化晚期的痕迹，当反转录酶样的细胞酶使能够从 RNA 转换得到 DNA 基因组。

无论它们的起源如何，大多数病毒基因与其宿主基因没有明显的相关性。这强化了 Varmus 和 Bishop 发现的唯一性，他们发现反转录病毒显然能够获得和**转换**（它们基因组中携带）细胞基因，虽然是偶然事件。它们基因组的可塑性揭示了反转录病毒的新用途，该用途于 20 世纪 80 年代开始走向繁荣：利用重组 DNA 技术，将多种兴趣基因引入反转录病毒基因组。所得到的病毒基因组能够被用作**载体**，来将这些基因转入体外培养的细胞和体内的活体肿瘤（后者应用通常被称为“基因治疗”）。

在 1975～1976 年，原癌基因 c-*src* 和癌基因 v-*src* 的结构在其被发现后几年内被迅速弄清楚。正如病毒遗传学家所设想的，所有的病毒转化序列都存在于单一病毒癌基因内。在 RSV 病毒的 RNA 基因组中，v-*src* 基因位于其基因组的 3′端，其之前是已有的用于病毒复制的三个反转录病毒基因（图 3.18）。

反转录病毒获取和激活 c-*src* 基因的方法导致了三个进一步的想法。首先，如果反

转录病毒能够激活这种原癌基因使其成为潜在的癌基因，那么其他类型的突变机制也许能够通过重塑正常的 *c-src* 来产生相似的结果。这些其他的突变机制在激活细胞原癌基因成为癌基因时，可能并不需要将正常基因从其所处的细胞染色体中移走。诱发肿瘤的信息也可能早已存在于正常细胞的基因组中等待被唤醒。

其次，RSV 病毒的所有转化能力都来自于其基因组中的单个基因 *v-src*。这一点非常重要，因为它揭示了正如长期以来所推测的，单独一个癌基因能够引发细胞形态上和生长行为上的极大改变。更普遍地说，这提示了其他能够引发癌症的基因也有多效的作用。相应的，如果一个被转化的、致瘤的细胞与正常细胞相比有 20～30 处不同的性质，这些多样的改变可能不是源自于 20～30 个不同基因的改变，相反，可能仅仅少数基因的改变就能够使正常细胞转化为致瘤细胞。

第三，RSV 和其 *v-src* 癌基因代表了其他类型的反转录病毒的行为模式，它们同样也能够在体外（培养皿中）转化被感染的细胞和在体内（活体组织中）诱发肿瘤。或许其他反转录病毒获得了其他与 *src* 无关的细胞基因。*c-src* 基因无疑是第一个被发现的原癌基因，其他细胞原癌基因可能隐藏于脊椎动物细胞的基因组中，等待着反转录病毒识别和激活。

3.10　脊椎动物基因组中携带有大量原癌基因

历史的偶然：一个长岛的养鸡农民和 Peyton Rous 于 1909 年的相遇，使 RSV 成为第一个被分离和细致描述的致瘤性反转录病毒。随后，RSV 开始受到最细致的分子和遗传学研究。然而，在 20 世纪 50 和 60 年代，人们在其他家禽和啮齿类动物中发现了另一些肿瘤病毒，随即确认为反转录病毒属的成员。

这些转化反转录病毒的多样性和它们所引发的疾病说明它们如 RSV 病毒一样可能携带有捕获的细胞原癌基因，并且可能利用这些获得基因来转化被感染的细胞。因此，在 *v-src* 和 *c-src* 发现的一年中，人们开始争相去寻找其他以相似的遗传途径传递的，同样携带其他潜在的有趣的原癌基因的病毒。

另外一种鸡反转录病毒——MC29 鸡白血病病毒，能够在鸡中诱发一种骨髓恶性肿瘤，也是这类病毒中的一种。MC29 基因组中也携带获得的细胞基因，称为 *v-myc* 癌基因，这种病毒利用其在被感染的鸡中诱发快速生长的肿瘤。正如 *v-src* 一样，*v-myc* 基因的起源可以追溯至正常鸡细胞基因组上相应的原癌基因。如 *src* 一样，在与反转录病毒基因组整合后，*myc* 基因也经历了一些重塑。这一重塑过程将其强致癌性传递给了某些基因，这些基因之前可能发挥良性的作用，或者是在正常鸡细胞的生命活动中发挥必需的作用。

有意思的是，MC29 如同 RSV 一样也是禽白血病病毒（ALV）的后代。这强调指出 ALV 等反转录病毒善于获得细胞基因组随机的片段。所获得的杂交病毒，其生物学能力将可能取决于具体选择的是哪个细胞基因。至于所获得的大部分细胞基因，携带这种基因的杂交病毒将不会表现出明显的表型，如诱发肿瘤的可能性。只有当被获得的能促进生长的细胞基因是原癌基因时，杂交的病毒可能展现出诱发肿瘤的表型，从而使其能够被发现并且最终被肿瘤学家分离。

人们在哺乳动物中也发现有反转录病毒，这些病毒与 ALV 关系不大，但却像 ALV 一样能够获取细胞原癌基因并将其转化为有力的癌基因。其中，猫科的白血病病毒在其基因组中获得 *fes* 癌基因，引发猫科的肉瘤，而一种杂交的大鼠-小鼠白血病病毒在不同情况下获得了两个不同的原癌基因：由此产生 Harvey 和 Kirsten 两种肉瘤病毒转化反转录病毒，在基因组中分别携带有 H-*ras* 和 K-*ras* 两种癌基因。在 10 年内，与反转录病毒相连的癌基因已经增加到了 20 多个，它们中的很多以最初被发现的病毒来命名（表 3.3）。至今通过这一途径，已经发现了 30 多个不同的脊椎动物原癌基因。

表 3.3 强转化性的反转录病毒及其携带的癌基因[a]

病毒名称	病毒癌基因	种属	主要病症	癌蛋白性质
Rous 肉瘤	*src*	鸡	肉瘤	无受酪氨酸受体
Y73/Esh 肉瘤	*yes*	鸡	肉瘤	无受酪氨酸受体
Fujinami 肉瘤	*fps*[b]	鸡	肉瘤	无受酪氨酸受体
UR2	*ros*	鸡	肉瘤	RTK 受体酪氨酸激酶，配体未知
髓细胞增生 29	*myc*	鸡	髓细胞性白血病[c]	转录因子
Mill Hill 病毒	*mil*[d]	鸡	髓细胞性白血病	Ser/Thr 激酶
鸟类成髓细胞性白血病 E26	*myb*	鸡	髓细胞性白血病	转录因子
鸟类成髓细胞性白血病 E26	*ets*	鸡	髓细胞性白血病	转录因子
鸟类成髓细胞性白血病 ES4	*erbA*	鸡	红白血病	甲状腺激素受体
鸟类成髓细胞性白血病 ES4	*erbB*	鸡	红白血病	表皮生长因子 受体酪氨酸激酶
3611 鼠类肉瘤	*raf*[e]	鼠	肉瘤	Ser/Thr 激酶
SKV770	*ski*	鸡	内皮瘤	转录因子
网状内皮组织增殖	*rel*	火鸡	未成熟 B 细胞淋巴瘤	转录因子
Abelson 鼠类白血病	*abl*	鼠	pre-B 细胞淋巴瘤	无受酪氨酸受体
Moloney 鼠类肉瘤	*mos*	鼠	肉瘤，红白血病	Ser/Thr 激酶
Harvey 鼠类肉瘤	*H-ras*	大鼠，鼠	肉瘤	小 G 蛋白
Kirsten 鼠类肉瘤	*K-ras*	鼠	肉瘤	小 G 蛋白
FBJ 鼠类肉瘤	*fos*	鼠	骨肉瘤	转录因子
Snyder-Theilen 猫类肉瘤	*fes*[f]	猫	肉瘤	无受酪氨酸受体
McDonough 猫类肉瘤	*fms*	猫	肉瘤	CSF-1 RTK
Gardner-Rasheed 猫类肉瘤	*fgr*	猫	肉瘤	无受酪氨酸受体
Hardy-Zuckerman 猫类肉瘤	*kit*	猫	肉瘤	青灰因子受体酪氨酸激酶
猴类肉瘤	*sis*	绒毛猴	肉瘤	血小板衍生生长因子
AKT8	*akt*	鼠	淋巴瘤	Ser/Thr 激酶
鸟类病毒 S13	*sea*	鸡	成红细胞白血病[g]	RTK 受体酪氨酸激酶，配体未知
骨髓增生性白血病	*mpl*	鼠	骨髓增生	TPO 受体
地区性家禽实验室 v. 30	*eyk*	鸡	肉瘤	RTK 受体酪氨酸激酶，配体未知
鸟类肉瘤病毒 CT10	*crk*	鸡	肉瘤	SH2/SH3 接头
鸟类肉瘤病毒 17	*jun*	鸡	肉瘤	转录因子
鸟类肉瘤病毒 31	*qin*	鸡	肉瘤	转录因子[h]
AS42 肉瘤病毒	*maf*	鸡	肉瘤	转录因子
Cas NS-1 病毒	*cbl*	鼠	淋巴瘤	SH2 依赖性遍在蛋白因子

缩写：CSF，集落刺激因子；EGF，表皮生长因子；G，GTP 结合；PDGF，血小板源性生长因子；RTK，受体酪氨酸激酶；Ser/Thr，丝氨酸/苏氨酸；SH，src 同源片段；TK，酪氨酸激酶；TPO，血小板生成素。

a 表中并未列出能产生这些癌基因的所有病毒。

b 哺乳动物 *fes* 癌基因的同源序列。

c 也可以引发癌症和内皮瘤。

d 哺乳动物 *raf* 癌基因的同源序列。

e 鸡 *mic* 癌基因的同源序列。

f 鸡 *fps* 癌基因的同源序列。

g 也可以引发粒性白细胞白血病和肉瘤。

h 行使转录抑制因子功能。

部分改编自 S. J. Flint，L. W. Enquist，R. M. Krug et al.，Principles of Virology. Washington，DC：ASM Press，2000. 以及 G. M. Cooper，Oncogenes. Boston：Jones and Bartlett Publishers，1995.

在各种情况下，存在于哺乳动物或者禽类 DNA 的原癌基因能够从所有其他脊椎动物的基因组中快速的检测出来。鸡、鼠和人类中的 *c-myc* 似乎各自在它们的宿主中行使相同作用。所有其他未发现的原癌基因可以说也是一样的。很快人们发现原癌基因的绝大部分都存在于脊椎动物这一所有哺乳动物和鸟类的共同祖先的基因组中，这一类基因与脊椎动物基因组中其他大多数基因一样，都遗传到了它们的子代中。

现在，1/4 个世纪过去了，这些转化的反转录病毒为肿瘤研究者了解细胞基因组和原癌基因提供了便捷窗口。如果没有这些反转录病毒，原癌基因的发现将极度困难。通过将原癌基因从细胞基因组中调出并且发掘出它们潜在的能力，这些病毒的研究使人们对肿瘤的认识在几十年中飞速发展。

3.11 慢性转化反转录病毒通过将其基因组插入细胞原癌基因旁来激活原癌基因

正如上面所描述的，当无转化的反转录病毒，如禽白血病病毒（ALV）或者鼠白血病病毒（MLV），从未被感染的宿主细胞基因组中捕获原癌基因，就会产生致瘤性的反转录病毒。实际上，无转化的前体病毒也能够诱发癌症，但是它们只有通过更长的时间才能做到这一点：这类病毒通常需要几个月的时间来引发癌症。承载有癌基因的反转录病毒则相反，通常在被注入宿主动物几天或者几周后即可诱发肿瘤。

当快速转化的反转录病毒被用于感染培养液中的细胞，细胞通常会经历形态学和生长行为的改变，显示出肿瘤细胞的行为特征（表 3.2）。相对而言，当慢速转化的肿瘤病毒，如 ALV 和 MLV，感染了细胞，这些细胞能够释放子代病毒颗粒，但是在形态或者生长行为上并不表现出任何明显变化。细胞形态学缺乏变化与这些病毒基因组中缺乏癌基因是一致的。

将这些事实综合起来，就会产生了一个较大的困惑。MLV 或者 ALV 一类的病毒如果不携带癌基因，是如何诱发恶性肿瘤的？这一疑惑于 1981 年得到解答。

解决的方法来自于对 ALV 在鸡体内诱发的白血病的研究，更准确地说，是通过对白血病细胞的基因组 DNA 进行详细分析。这些细胞常常携带有 ALV 前体病毒整合于它们的基因组。一些研究者着手绘制 ALV 前体病毒在染色体 DNA 上整合位点的图谱。在这些试验开始的时候，也就是 Temin 和 Baltimore 的研究发现十年之后，人们已经知道前病毒在被感染宿主细胞染色体 DNA 上的整合位点是随机的。如在鸡的基因组中，可能存在几百万个不同的可能被 ALV 用于整合其前病毒的染色体位点。

但是在一连串在不同的鸡中由 ALV 引发的白血病的分子研究得到了令人惊讶的结果。在大多数（$>80\%$）这类白血病细胞基因组中，ALV 前病毒都整合在 *c-myc* 原癌基因的染色体 DNA 位点附近（图 3.22）！这一发现，本身就很难与前病毒在被感染细胞基因组上存在几百万个可能的随机整合位点的观点相一致。

很快人们就查明，整合病毒基因组和细胞 *c-myc* 基因之间较近的自然距离使两个遗传元件之间具有一种功能上的联系。病毒转录启动子嵌套于 ALV 前病毒中，破坏了 *c-myc*基因正常表达的调控机制（图 3.22）。现在，细胞 *c-myc* 基因不再受自身基因启动子的调控，而被直接置于病毒的转录调控之下。由此，相比较在正常细胞周期内受到

精密的上调或下调，而 *c-myc* 的表达被外来统治者接手，将其表达量保持在较高水平。基本上，白血病细胞染色体中产生的杂交的病毒-细胞基因起到类似于禽髓细胞瘤病毒携带的 v-*myc* 癌基因的作用。

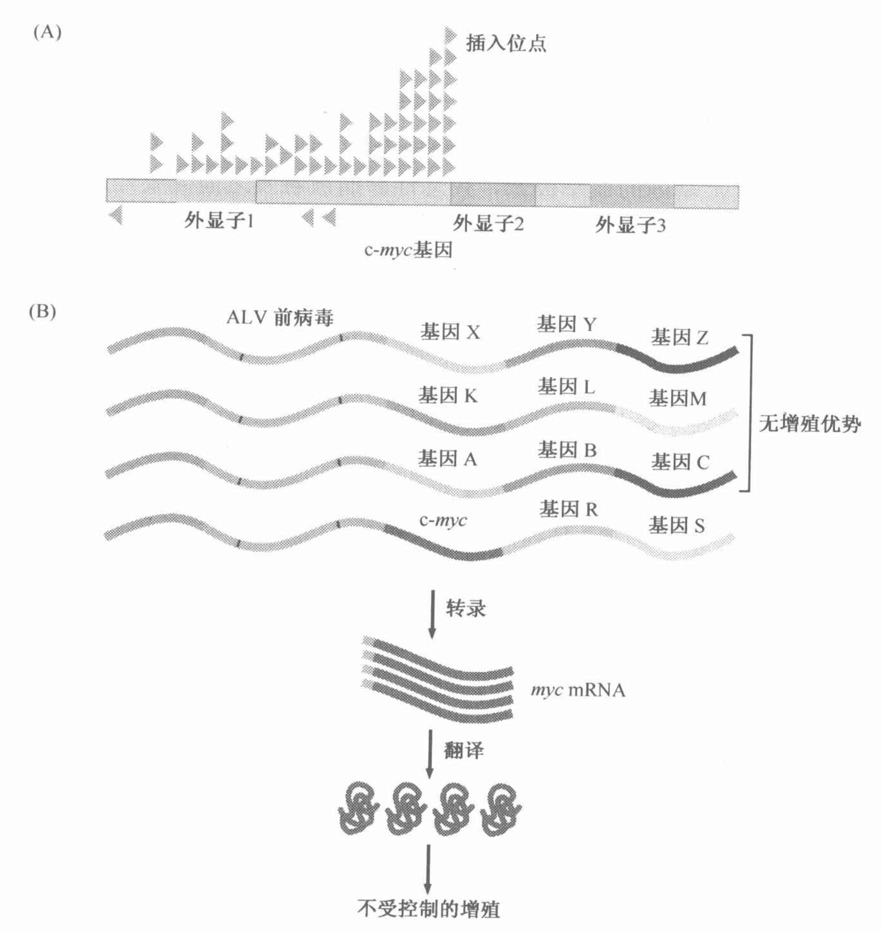


图 3.22 插入突变 没有获得癌基因的病毒的致癌作用，可以通过将其前病毒 DNA 整合到邻近细胞原癌基因的位点。(A) 对众多由 ALV 引发的 B 细胞淋巴瘤的分析表明，大部分 ALV 前病毒整合到携带 *c-myc* 原癌基因的染色体 DNA 片段；其中大部分整合于 *c-myc* 基因第一个非编码的外显子和第二个外显子之间，*myc* 基因的可码框就由此开始。整合的位点用填充的三角形标志。如图所示，大多数但不是全部的前病毒的整合都与 *c-myc* 基因的转录方向相同。(B) 这一行为能够如下解释。在 ALV 感染鸡淋巴细胞时，ALV 前病毒（绿色）在淋巴细胞染色体 DNA 的几百万个不同位点随机进行整合。一个偶然的机会，ALV 前病毒整合于 *c-myc* 原癌基因（红色）中。随后可能造成 *c-myc* 基因的转录被 ALV 的强组成型启动子控制。因为高水平 Myc 蛋白能够有力的促进细胞增殖，携带这个特殊的整合前病毒和活化的 *c-myc* 基因的细胞将会不受控制繁殖，最终产生大量的后代构成淋巴瘤。（Adapted from S. J. Flint，L. W. Enquist，R. M. Krug et al.，Principles of Virology. Washington，DC：ASM Press，2000.）

突然间，所有用于解决由 ALV 引起白血病困惑的线索依次出现。在鸡感染的过程中，ALV 在鸡的造血系统中迅速传播至上千然后上百万个细胞，这种感染非常成功，使得整只鸡充满病毒，也就是说它的血液携带高浓度的病毒颗粒。

这些上千万个感染中的任何一个都能够导致在被感染细胞基因组中的一些随机位点

插入 ALV 前体病毒。在大多数情况下，这种前体病毒的整合除了致使宿主细胞生产大量的后代病毒颗粒外，对宿主细胞不产生任何影响。但是在极低的概率下，可能低至千万分之一的感染，前病毒碰巧整合于 *c-myc* 基因旁边，这将最终导致一个爆炸性的结果——*c-myc* 基因转化为一个有效的癌基因。

携带这种不受调控的 *myc* 基因的细胞随后开始不受控制的增殖，在几周内，一些子代细胞进一步发展成为构成白血病的更具侵略性的肿瘤细胞。

这一过程解释了从家禽最初发生病毒感染后引发白血病的缓慢的动力学。由于通过前病毒整合激活 *c-myc* 基因的概率极低，在恶性肿瘤被触发之前需要经历几周的时间和发生几百万被感染的事件。这种特殊的原癌基因的激活机制被称为**插入性突变**；这同时解释了其他慢性作用反转录病毒的致白血病能力，如 MLV。至今，对禽类和鼠类反转录病毒引发感染的研究证明，整合事件的发生多位于 25 个不同的细胞原癌基因邻侧。确实，插入突变能够作为发现新的原癌基因的有效方法（信息栏 3.8）。

信息栏 3.8　插入突变能够发现新的原癌基因　如先前所描述的（见 3.10 节），对快速转化反转录病毒基因组的分析使研究者能够识别一大群原癌基因。插入突变的现象的首次发现是 ALV 基因组插入邻近 *c-myc* 原癌基因的位点，该现象为这些细胞基因的发现提供了可选的方法。这样，研究者就能够研究一系列独立的由反转录病毒引发的肿瘤，这些反转录病毒如 ALV 或者 MLV 已知缺乏自身的癌基因。更特别的是，研究者能够研究在肿瘤细胞的染色体 DNA 中宿主细胞序列的位置，这些序列邻近整合的前病毒。人们希望发现前病毒反复整合于同一个细胞基因旁边，该基因的活化能够被前病毒的转录启动子触发。相邻的基因能够很容易的克隆得到，因为它被紧邻的前病毒 DNA 有效的标记。

该策略的最初果实出现于对小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV）引发的乳腺癌的研究，MMTV 也是一种反转录病毒。研究人员绘出了由 MMTV 引发的小鼠乳腺癌细胞基因组中 MMTV 前病毒的整合位点的图谱。大多数前病毒整合于三个可选基因位点之一，集中于 *int*-1、*int*-2 和 *int*-3 细胞基因的旁侧（表 3.4）。随后发现这些基因能够编码一种刺激细胞增殖的蛋白质。由旁边 MMTV 前病毒整合引发的这些基因中任何一个的失控表达，似乎都能够触发细胞增殖而引起乳腺癌的发生。

int-1 基因与果蝇的无翅基因同源，被重命名为 *Wnt*-1，它是 *Wnt* 系列基因的先驱，而 *Wnt* 基因又被证明是脊椎动物很重要的**分裂素**和**生长素**，如控制生长的重要因子。最近，这一研究策略被用于研究另一大类细胞基因，它们中的任何一个被由 MLV 介导的插入突变所激活都将在小鼠中触发白血病（表 3.4）。

表 3.4　能够被插入性突变激活的细胞基因的例子

基因	插入性突变基因	肿瘤类型	种属	癌蛋白的类型
myc	ALV	B 细胞淋巴瘤	鸡	转录因子
myc	ALV，FeLV	T 细胞淋巴瘤	鸡，猫	转录因子
nov	ALV	肾胚细胞瘤	鸡	生长因子
erbB	ALV	成红细胞增多症	鸡	受体酪氨酸激酶
mos	IAP	浆细胞瘤	鼠	Ser/Thr 激酶
int-1[a]	MMTV	乳腺癌	鼠	生长因子
int-2[b]	MMTV	乳腺癌	鼠	生长因子
int-3	MMTV	乳腺癌	鼠	受体[c]
int-H/int-5	MMTV	乳腺癌	鼠	酶[d]
pim-1	Mo-MLV	T 细胞淋巴瘤	鼠	Ser/Thr 激酶

续表

基因	插入性突变基因	肿瘤类型	种属	癌蛋白的类型
pim-2	Mo-MLV	B细胞淋巴瘤	鼠	Ser/Thr 激酶
bmi-1	Mo-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	转录抑制物
tpl-2	Mo-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	无受体酪氨酸激酶
lck	Mo-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	无受体酪氨酸激酶
p53	Mo-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	转录因子
GM-CSF	IAP	粒单核细胞白血病	鼠	生长因子
IL2	GaLV	T细胞淋巴瘤	长臂猿	细胞因子[e]
IL3	IAP	T细胞淋巴瘤	鼠	细胞因子
K-ras	F-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	小G蛋白
CycD1	F-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	G_1 细胞周期蛋白
CycD2	Mo-MLV	T细胞淋巴瘤	鼠	G_1 细胞周期蛋白

a 后来重命名为 *Wnt-1*。

b 后来证实为编码成纤维生长因子（FGF）的基因。

c 与 notch 受体相关。

d 雄激素向雌激素转变的酶。

e 细胞因子是调控各种类型造血细胞的生长因子。

缩写：ALV，avian leucosis virus 禽类白血病病毒；FeLV，feline leukemia virus 猫白血病病毒；F-MLV，Friend murine leukemia virus 弗里德小鼠白血病病毒；GalV，gibbon ape leukemia virus 长臂猿白血病病毒；GF，growth factor 生长因子；IAP，intracisternal A particle 池内 A 因子（a retrovirus-like genome that is endogenous to cell 细胞内的反转录病毒样基因组）；Mo-MLV，Moloney murine leukemia virus 莫洛尼（氏）鼠白血病病毒；MMTV，mouse mammary tumor virus 小鼠乳腺瘤病毒；Ser/Thr，serine/threonine 丝氨酸/苏氨酸；TK，tyrosine kinase 酪氨酸激酶。

部分改编自 J. Butel，Carcinogenesis 21：405-426，2000；and from N. Rosenberg and P. Jolicoeur，in J. M. Coffin，S. H. Hughes and H. E. Varmus（eds.），Retroviruses. Cold Spring Harbor，NY：Cold Spring Harbor Laboratory Press，1997. Also in part from G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston：Jones and Bartlett Publishers，1995.

由基因插入而导致的细胞突变是另一个振奋人心的发现：非病毒的致癌物质或许也能够产生如 ALV 一样的结果。或许这些其他的致癌物质，包括 X 射线和化学诱变剂，能够改变细胞原癌基因，而这些基因存在于细胞染色体中的正常位置。这一结果可能是对细胞生长调控的打乱，这种调控如同导致 ALV 引发的白血病的结果一样不稳定。

3.12　一些反转录病毒携带癌基因

在本章中对反转录病毒的描述表明这些病毒基本可以分为两类。一些病毒不携带癌基因，如 MLV 和 ALV，但是能够在初始感染后经历较长的潜伏期（如几周）后在宿主动物上引发肿瘤。其他病毒，如 RSV，则能够快速引发肿瘤（如在几天或者几周内），从细胞原癌基因前体中获得癌基因。

在现实中，还存在第三类反转录病毒与上述两种模式都不相符。人类 T 细胞白血病病毒（HTLV-I）感染了约 1%的日本南部岛屿九州的居民。在一些加勒比海岛屿也同时出现一种地方性疾病，虽然发病率较低。终生的 HTLV-I 病毒的感染具有 3%～4%的概率发展为成年 T 细胞白血病，并且这些病毒似乎能够通过乳汁传输和母婴传输持续存在于在人群中。

尽管进行了广泛的分子鉴定，没有任何迹象表明 HTLV-I 前病毒整合位点聚集在特定的染色体区域。相应的，HTLV-I 显然不太可能运用插入突变来引发白血病。取而代之，它引发白血病通过由病毒基因编码一个或多个病毒蛋白来实现的。这其中了解最透彻的是病毒 *tax* 基因，它的产物能够激发前病毒 DNA 序列的转录，由此产生后代 RNA 基因组。与此同时，*tax* 基因产物似乎能够激活两个细胞基因的转录，这两个基因分别编码重要的促进生长的蛋白质 IL-2（白细胞介素-2）和 GM-CSF（粒细胞巨噬细胞集群刺激因子）。这些“生长因子”，我们将在第 5 章中提及，由被病毒感染的细胞释放，能够促进几种类型造血细胞的增殖。而由此引发的增殖，就其自身而言不会直接造成白血病，似乎是那些由 HTLV-I 刺激的细胞以较低但是能预测的频率促进新型变异体的产生。在这一例子中，特定病毒癌基因的表达，特别是 *tax*，似乎是宿主动物中反转录病毒复制周期固有的和必要的组成成分，而不是罕见的产生稀有杂交基因组的遗传事故的结果，如 RSV 基因组。

3.13 总结与展望

通过在实验室和人工饲养的动物身上进行研究，肿瘤生物学家于 20 世纪发现了大量能够引发肿瘤的病毒。许多这种病毒都具有 DNA 或者 RNA 基因组，它们能够感染培养液中的细胞，并且将其转化为致瘤的细胞。这种转化的能力表明在病毒的基因组中存在强有力的癌基因，这些癌基因足够诱发许多与肿瘤细胞相一致的表型出现（见表 3.2）。此外，这些病毒具有能够在培养皿中导致细胞转化的能力，为其诱发肿瘤机制的研究点亮了方向。

通过对 RNA 肿瘤病毒，特别是 Rous 肉瘤病毒的细致研究，产生了一个重要概念的革命。RSV 的癌基因称为 v-*src*，起源于正常的细胞基因称为 c-*src*。这个发现揭示无转化性的慢性致瘤反转录病毒，如 ALV（禽白血病病毒），具有获取正常组织基因并将这些基因转化为高效的转化癌基因的能力。遗传获取之后得到的杂交病毒能够在被感染宿主中快速诱发肿瘤。

更重要的是 c-*src* 基因的发现。它在正常细胞基因组中的存在证明细胞基因组携带原癌基因并且能够被转化为癌基因（转换的细节将在接下来几章中描述）。很快，大量来源于禽和哺乳动物的反转录病毒被发现携带有其他的癌基因，这些癌基因是从被感染的细胞基因组以类似的方式获得的。而其中每个致癌基因都原先被发现在一种或不同的脊椎动物基因组中，我们现在知道所有这些基因本来就存在于脊椎动物的基因组中。一般脊椎动物的基因组都携带许多此类正常基因，它们中的每一个都有被转化为有活性癌基因的潜力。

然而，其他原癌基因的发现则是通过研究由无转化功能的反转录病毒引发的肿瘤，其基因组中原癌基因的整合位点到达的，如鼠类白血病病毒（MLV）和 ALV。这些原癌基因染色体 DNA 的随机整合偶尔通过插入突变的方法使原癌基因转变为有活性的癌基因，由于与前病毒的紧密结合，这些癌基因能够被迅速的分离。在一些情况下，插入突变引起已知的原癌基因的再发现，因为它同样存在于有强转化能力的反转录病毒中：*myc* 和禽髓细胞瘤病毒的研究（AMW）证明了这一情况。在另外的情况下，真正的新

原癌基因在针对前病毒整合位点的研究中被发现：被 MMTV 活化的 *int*-1 基因的发现为了解这一途径提供了很好的例子。实际上，只有一小部分肿瘤生物学家对插入突变感兴趣，直至有报道说在几个接受基因治疗的患者上导致了肿瘤的发生（信息栏 3.9）。

信息栏 3.9　基因治疗偶尔可能导致悲惨的结局　基因治疗被发现最适用于造血系统疾病。因此，由于免疫系统关键性组分缺失而引起的先天患有免疫缺陷的小儿，原则上能够通过运用反转录病毒将缺失的基因转入他们的骨髓干细胞而治愈（见信息栏 3.7）。在体外被基因转导反转录载体感染后，干细胞被引入患儿使他们骨髓中的细胞被稳定的移植。这些移植的、发生遗传改变的干细胞的分化的子代能够提供缺失的免疫功能，由此可以转变先天性的免疫缺陷。

这种基因治疗的方法在法国首先创始于法国，10 个患有前天性免疫缺陷（X 联合的严重结合的免疫缺陷）的儿童的骨髓干细胞被用 Moloney 鼠白血病病毒（MLV）衍生的反转录病毒载体感染，该载体能够转导编码患儿缺乏的 γc 蛋白的基因。其中 9 名儿童戏剧性地重建了他们的免疫功能。然而，据 2003 年报道，其中两名最年幼的患儿在接受基因治疗的 30 周和 34 周后患上了 T 细胞白血病。第三例病例在晚些时间被报道。

在这些案例中，对白血病细胞 DNA 的分析显示从病毒载体获得的前病毒整合于 LM02 基因第一个外元的几千个碱基对，LM02 基因是一种癌基因，先前被发现能够在人类 T 细胞白血病中被激活。给定 LM02 癌基因在白血病生成中的已知作用，这些插入的前病毒几乎确定对三种白血病的触发起作用。因此，能够引发肿瘤形成的插入突变，作为人们长期担心的可能但是遥远的基因治疗可能招致的风险，变成了令人感兴趣的现实，并且最终可能限制基因治疗在纠正先天性缺陷的方面的应用。

对原癌基因和癌基因的发现所引发的问题如同它们解决的问题一样多。反转录病毒编码的癌基因蛋白质（称为**癌蛋白**）在功能上是如何不同于与相应的原癌基因所编码的蛋白质？癌蛋白转化细胞的生化机制也还仍然是模糊的。

DNA 肿瘤病毒转化细胞的分子机制则更加难以捉摸，因为这些病毒似乎特定编码许多癌蛋白，它们与宿主细胞合成的癌蛋白的蛋白质非常不同。这种不同显示这些病毒癌蛋白不能够通过任何简单显而易见的方式使自己进入细胞生长调控机制。仅在 20 世纪 80 年代中期，该研究开始十年后，它们的转化机制开始明朗化，我们将于第 8 章和第 9 章对其进行阐述。

对于很多肿瘤研究者和支持这一研究的公众而言，有一个推动此研究工作前进的最重要的问题：这些病毒和其所激活的原癌基因在人类癌症的发生中是否起关键作用？正如我们即将学习到的，全世界发生的癌症中大约 1/5 是与感染性物质相关的。Hepatitis B 和 C 病毒（HBV、HCV）如人类的乳头瘤病毒（HPV）一样，在触发常见的肿瘤方面都起到非常重要的作用。确实，甚至不常发生的家族性人类肿瘤在近几年中也被追溯至病毒感染（信息栏 3.10）。所以病毒在肿瘤发病机制中的作用是重要的并不断被认识深化。

但是，尽管 RNA 和 DNA 肿瘤病毒并不仅仅是引发单个人类肿瘤的案例，我们应该正确看待对其转化机制的研究。这项研究拉开了探寻在各种类型的人类肿瘤中发挥主要作用的自身基因的序幕。这在基因和分子水平上大大加速了我们对肿瘤发病机制的了解，使得肿瘤研究有了飞跃性的发展，其从描述性的科学发展成为能够用精确和系统的术语了解和解释复杂现象的科学。

信息栏 3.10　典型的 Kaposi 肉瘤是一种家族疾病　一些由病毒引发的恶性肿瘤局限于小的亚群和相似的家族性癌症综合征。我们将在第 7、8、9 和 12 章中见到很多这种综合征。在那里，我们将学习到肿瘤抑制基因和 DNA 修复基因的突变型等位基因的遗传特征能够创造很强的先天性癌症遗传缺陷。

在 AIDS 流行病开始之前，Kaposi 肉瘤（KS）病明显是一种细胞的恶性肿瘤，这些细胞与形成淋巴管内皮层的细胞相关，它在很大程度上被限制在小亚群中，主要是地中海和犹太民族。这类似于一种家族性癌症，这种癌症的素因性等位基因只存在于特定民族亚群的基因库中。在 AIDS 流行病开始后，KS 的发病率提高了 1000 倍，至少这种形式的 KS 能够与感染性媒介物——人类疱疹病毒-8（HHV-8）联系起来，该病毒又被称为 KSHV（KS 疱疹病毒）。这种病毒，与其他大量传染性媒介物一起，是一种机会性病原体，它们能够在缺乏功能性免疫系统的体内大量生长。由于非洲的 AIDS 流行病，KS 现在成为全世界第四大常见的由感染引发的癌症。

HHV-8 的病毒学不能够解释艾滋病前期的 KS 是如何在具有免疫能力的人群中传播的。确实，这些肿瘤也与 HHV-8 感染有关。对各种 HHV-8 次代株进行的检测，正如病毒 DNA 中序列多态性所确定的，揭示了在不同亚群的犹太人存在不同的病毒亚株；一种亚株在北欧犹太人（现在的欧洲后代）中起主导作用，而第二种亚株在西班牙犹太人（北非和中东后代）中比较常见。两个人群的感染率比无 AIDS 的西方人群的高 10～20 倍。引起兴趣的是，在这些亚群中，特异性 HHV-8 亚株的传播与特定线粒体 DNA 多态性的遗传特性的相关性强于与 Y 染色体多态性标记的联系。线粒体 DNA 是通过母亲传输的，暗示病毒的母体传输对于在家族谱系中建立疾病 pockets 中起重要作用，这一家族谱系可能能够回溯到 2000 年前这一人群的创始人［另外一条母体传输的途径也许能够解释日本南部成年人 T 细胞白血病（由 HTLV-I 反转录病毒引发）的高发病率（见 3.12 节）］。

因此，集中于特定地理和民族的恶性肿瘤，如典型的 KS 和成年人 T 细胞白血病，主要是由于病毒几乎不能进行水平的传播（如从一个成年人到另一个成年人），却能够在长时间亲密的接触中垂直传输（在母代与子代之间）。这引起具有较高乳腺癌发病率的特定小鼠株行为的回应。如最初于 1933 年在缅因州的 Bar 港展示的，当高发病率的母本与低发病率的父本交配，疾病能够由亲代传递给子代；但如果情况相反则不会引起疾病的传递。同样，当高发病率的雌性小狗在出生 24h 内交由低发病率的养母养育，则最终只有 8%的会发生乳腺癌，相比较，如果交给高致病性小鼠养母养育则展示出 92%的发病率。这引出下列结论，乳腺癌易感性是通过母汁传染性物质由一代传递至另一代，这种传染性物质后来被鉴定是小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV）。

重要概念

- Peyton Rous 1910 年的发现支持肿瘤可能是传染性疾病的观点，他发现 Rous 肉瘤病毒（RSV）能够在家禽体内引发肿瘤，但是这一观点于 1926 年失去了可信性，当时 Fibiger 的大鼠的胃损伤最终被查明是由维生素缺乏造成的而不是肿瘤感染。
- 几十年后，Howard Temin 和 Harry Rubin 发现培养液中被 RSV 感染的细胞转化为胃肿瘤细胞，这复苏了肿瘤病毒的研究并且使人们认识到肿瘤能够在细胞水平进行研究。
- 培养液中转化了的细胞显示出以下几种性质：①与正常细胞不同，被转化的细胞丧失了接触抑制作用，由此显示多层细胞簇，也就是“焦点”；②“焦点”是同源细胞的生长物，所有的细胞都由一个共同的原代细胞产生；③“焦点”中的细胞通常以不依赖于贴壁的方式生长。

- 在宿主动物中的致瘤性实验是用于检测细胞恶性转化程度。
- 由 RSV 感染诱发的转化的表现型能够传递给子代细胞，利用 RSV 温度敏感性突变株（ts）进行的试验说明，转化状态的保持依赖于 RSV 基因产物持续的活性。
- 除 RSV 这类 RNA 病毒外，几种 DNA 病毒也能够诱发肿瘤，包括乳多空病毒、人类腺病毒、疱疹病毒和发疹的病毒。
- RNA 病毒的基因组由单链 RNA 构成，而 DNA 病毒的基因组则是由双链 DNA（dsDNA）构成。包括 Shop 乳头瘤病毒、小鼠多瘤病毒和 SV40 病毒等的乳多空病毒具有环状双链 DNA 基因组，而腺病毒和疱疹病毒具有长的、线性双链 DNA 基因组。如 SV40 病毒一样，人类腺病毒在能够其自然和允许的宿主内复制随后引发细胞溶解，但是却不能在非允许的宿主细胞内进行复制，取而代之的是使这些细胞发生转化。
- 由于病毒 DNA 基因组复制的发生不依赖于宿主细胞的 DNA，并且病毒的基因组缺乏在有丝分裂中适当分离的元件，DNA 肿瘤病毒基因组由一代细胞向另一代的传递就带来了一个概念性的问题，直到人们发现 DNA 肿瘤病毒基因组能够整合到宿主细胞染色体 DNA 后才解决。
- 因为 RNA 病毒基因组由单链 RNA 构成，不能与宿主 DNA 整合，并且再感染也不能解释子代细胞是如何保持转化状态的，Temin 假设 RNA 病毒能够以一种前所未闻的反转录方式建立基因组的双链 DNA 拷贝，而作为正常病毒复制周期的一部分，所得到的 DNA 拷贝能够与宿主的染色体 DNA 整合。这与 DNA 肿瘤病毒有很大差距，对于 DNA 肿瘤病毒来说整合是非常罕见和偶然的事件，它不是病毒复制过程的一部分。
- 因为复制周期依赖于信息的反向流动（由 RNA 到 DNA），RNA 病毒被称为反转录病毒，而这类病毒基因组的 DNA 形式被称为前病毒。
- 在对 RSV 病毒的研究中，研究者发现病毒复制和细胞转化由不同的基因执行，其中转化的功能由单独的一个称为 *src* 的基因执行。
- 通过应用特异性识别 RSV 基因组中与转化相关序列（如 *src*）的 DNA 探针，研究者惊奇的发现与 *src* 相关的序列存在于未被 RSV 感染的鸡细胞的 DNA 中。进一步的研究显示 *src* 基因是一种存在于所有脊椎动物的正常的高度保守的基因（其他很多这类基因也被证明具有这种性质）。
- *src* 存在两种形式，支持正常细胞功能的细胞形式（c-*src*）和作为癌基因的病毒形式（v-*src*），这是由于 v-*src* 在被原代 RSV 病毒从细胞基因组中捕获出后发生变化。
- 因为可以作为癌基因的前体，c-*src* 被称为原癌基因，这个名词暗示普通的脊椎动物细胞也具有能够诱发肿瘤的内在潜力。
- 由反转录病毒获取和激活 *src* 说明，单个癌基因能够引起细胞特征的众多变化，其他突变机制也有激活原癌基因的可能性，而原癌基因是要继续留在细胞基因组中它们正常的位点的。
- 一些反转录病毒能够诱发癌症，尽管它们的基因组中并不携有癌基因；这些病毒比起携有癌基因的病毒诱发癌症的作用更加缓慢。这类无转化、缓慢致瘤的反转录病毒通过将它们的基因组插入细胞染色体中这些原癌基因的旁侧来使其激活，这种方式称为插入突变。这一偶然事件将原癌基因置于病毒转录启动子的调控中，使基因表达脱离正常调控并且导致了细胞不受控制的增殖。插入突变能够用于发现新的原癌基因。

• 除了无转化的反转录病毒（通过插入突变起作用）和急性转化反转录病毒（通过获得癌基因起作用），反转录病毒的致瘤能力都能够追溯至它们自身正常的基因产物。一个相关的例子是人类的T细胞白血球过多病毒（HTLV-I），它的*tax*基因编码一种蛋白质能够激活前病毒DNA的转录，作为副作用，同时也刺激引发细胞增殖的细胞生长因子的表达。

思考问题

1. 支持和反对肿瘤是传染性疾病的发现各有哪些？
2. 如何证明肿瘤病毒基因组对病毒诱发的肿瘤保持转化状态是必需的？试想哪种遗传机制使“打了就跑”的方式成为可能，并且在特定的阶段后，维持肿瘤的表型并不需要肿瘤病毒的存在？
3. 为什么携带癌基因的病毒，如Rose肉瘤病毒等，在众多的家禽中如此罕见？
4. 哪些证据在体外被肿瘤病毒转化的细胞能够获得与体内转化细胞相似的表型？
5. 何种基本原理提示肿瘤病毒基因组的染色体整合是RNA肿瘤病毒复制循环内在的、不可缺少的部分，但对于DNA肿瘤病毒复制，它是一个不经意的副产物？
6. 何种证据显示类似于原癌基因的*src*实际上是一个正常的细胞基因，而不是被反转录病毒插入到体细胞中去的？
7. 试想DNA肿瘤病毒和反转录病毒样的禽类白细胞增生病毒是如何从远古进化而来的？
8. 为何禽类白细胞增生病毒需要经过如此长时间来诱发肿瘤？

参考读物

Bishop JM (1985) Viral oncoproteins. *Cell* 42, 23–38.

Boshoff C (2004) Kaposi virus scores cancer coup. *Nat. Med.* 9, 261–262.

Bruix J et al., (2004) Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 5, 215–219.

Bute J (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21, 405–426.

Carbone M, Pass HI, Miele L and Bocchetta M (2003) New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene* 22, 5173–5180.

Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE (eds.) (1997) Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Evans AS and Mueller NE (1990) Viruses and cancer: causal associations. *Ann. Epidemiol.* 1, 71–92.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (eds.) (1996) Field's Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott–Raven.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM et al. (2000) Principles of Virology. Washington, DC: ASM Press.

Kung HJ, Boerkoel C and Cater TH (1991) Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: a review with insights into the mechanisms of insertional activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 171, 1–15.

López-Rios F, Illei PB, Rusch V and Ladanyi M (2004) Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high-risk, false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet* 364, 1157–1166.

Newton R, Beral V and Weiss R (1999) Human immunodeficiency virus infection and cancer. *Cancer Surv.* 33, 237–262.

Parsonnet J (ed.) (1999) Microbes and Malignancy: Infection as a Cause of Human Cancers. London, UK: Oxford University Press.

Phillips AC and Vousden KH (1999) Human papillomavirus and cancer: the viral transforming genes. *Cancer Surv.* 33, 55–74.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM and Vogt PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260,170–173.

Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J (eds.) (1985) Molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254, 1167–1173.

（黄常志　马怡茗　钟佳伶）

第 4 章　细胞癌基因

关于大多数恶性肿瘤起源于病毒这一点，已经是毫无疑问的了。要假定出人类肿瘤的其他病因起源无疑是很困难的。

Ludwik Gross，肿瘤病毒学家，1970 年

对于人类肿瘤的产生，20 世纪 70 年代发现的 DNA 和 RNA 肿瘤病毒为癌生物学家提供了一个简单而有力的理论。在人类种群中普遍存在的病毒有一定的机会感染易感组织，并且导致被感染细胞的转化。这些细胞接下来会繁殖，迟早会形成我们在临床上经常遇见的细胞团。那些能够使正常的啮齿类动物细胞和鸡细胞转化成恶性肿瘤细胞的病毒，实际上只含有几个有限数目的插入基因，因此我们认为这些病毒可能有转化人类细胞的能力。

但是随着研究的深入，尽管肿瘤与病毒有关的理论一如既往的诱人，人们却发现，在这个理论上把人类肿瘤的生物学和流行病学统一起来变得越来越困难。大多数的人类癌症不会像传染病一样从一个个体传播到另一个个体。人们很难找到具有哪怕一些传染病特性的典型癌症病例。更重要的一点，自 20 世纪 70 年代以来企图从大多数人类肿瘤中分离出病毒的实验都以失败告终。在西方国家常见的肿瘤当中，只有两种肿瘤——宫颈癌和**肝癌**可以清楚地找到病毒诱因。

这些发现引起了两种不同的反应。那些坚持认为病毒是所有人类肿瘤诱因的人们争辩说，当潜伏在人类体内的病毒接触到物理或化学的致癌物时，它们诱发肿瘤的能力就会被激活。另外的研究者则完全抛弃了病毒致癌说，转而在人类基因组成千上万的基因中寻找潜在的致癌者。后者最终成功了。80 年代后期，人们认识到人类细胞基因组中包含有众多促进肿瘤细胞增殖的基因。

曾经被认为是关键癌症诱因的肿瘤病毒，最终没能到达人们期望的位置。但是关于肿瘤病毒的研究却在证明细胞基因是肿瘤发生的起源中，起到了关键的作用。在接下来的年代中，癌基因和抑癌基因的发现，都要直接归功于那些早期的寻找癌症感染性诱因的努力。

4.1　激活体内的反转录病毒是否可以导致癌症?

20 世纪初日本科学家 Katsusaburo Yamaagiwa 的研究揭示，化学物质可以诱导实验动物发生癌症（见 2.8 节）。该研究发现，在兔耳上连续数月反复涂布煤焦油可以引发皮肤癌。20 年代中期法国巴黎的一篇博士论文记载描述了百余例癌症病例，其中大多数为皮肤癌，这些患者都有工作在 X 射线环境中的经历。这两个研究展示的癌症诱因都是非生物性的，或者为化学有机物或者为射线（见 2.8 节和 2.9 节）。

这些研究结果在 20 世纪中叶被广为人知，但是却很难与当时流行的病毒致癌理论统一，那时人们认为所有的癌症都是由一种感染性因素引起的，即肿瘤病毒。到了 70

年代，那些支持病毒致癌说的研究者，尤其是其中从事反转录病毒研究的人，为了应对这种情况推出了一种新的学说。他们的模型揭示了肿瘤病毒是如何在没有明显的外部感染情况下，参与肿瘤发生的。

这种新学说的产生源于反转录病毒的特殊生物特性。在某些情况下，反转录病毒基因组可以整合到脊椎动物的生殖细胞基因组中，由此产生的前病毒可以像孟德尔等位基因一样从一代遗传到下一代（信息栏 4.1）。而且这些体内的**前病毒**多数情况下是转录沉默的，它们的存在也是不明显的。只有在很少的情况下，这些潜伏着的前病毒才会被唤醒表达，这时它们就会恢复产生具有感染性反转录病毒颗粒的能力。

当培养某些特定种系小鼠分离的成纤维细胞时，在其中加入溴代脱氧尿嘧啶，这些细胞中潜伏的内源反转录病毒就会被激活。以前因为内源反转录病毒转录沉默，这些细胞表面上好像并没有被病毒感染，但在这个时候，它们立即开始分泌病毒颗粒。小鼠体内也有相似的情况，某些细胞中潜伏的前病毒有可能自激活。当病毒从这些细胞中释放出来以后，它们就会不断地增殖，迅速分布到全身各处，然后诱发动物发生白血病。

因为内源反转录病毒具有的这些特性，有研究者怀疑人类癌症可能以相似的方式发生。比如具有诱变能力的致癌物，如烟叶中的焦油，就有可能激活潜伏的内源反转录病毒。由此产生的病毒颗粒不断增殖分布到全身，然后导致易感组织发生癌症。同时因为这些内源病毒有可能不能在个体之间传播，这就解释了为什么癌症不像传染病一样。另外一个相关的理论假设，反转录病毒将病毒癌基因插入生殖细胞中，而这些潜伏的病毒癌基因在接触到致癌物以后就会被激活。

尽管这些理论非常诱人，但是人们始终不能从人类肿瘤组织中分离到感染性的反转录病毒颗粒，关于人类癌症起源的病毒模型还是因为缺乏证据而很快垮台。

信息栏 4.1　内源性反转录病毒理论可以解释在没有外源病毒感染的情况下肿瘤发生的原因　鼠或者鸡一类动物的生殖系统常常被病毒感染，感染常导致反转录病毒的基因整合入生殖细胞的基因组中（见 3.7 节），整合的反转录病毒基因具有和其他正常基因一样的遗传结构。当这些生殖细胞参与受精后，那些整合入的前病毒也就转移到受精卵和随后发育成的胚胎以及成熟个体当中（见图 4.1）。现在所有动物的基因组当中，都隐藏有从远古祖先遗留下来的这类前病毒。这些病毒被命名为内源性病毒，以便与个体之间相互感染传播的外源病毒相区分。

具有转录活性的那些内源性前病毒常常会引起动物发生病毒血症，使动物在幼龄时就发生癌症。这类病毒通常会很快被从基因库中清除掉。这就解释了为什么在大多数物种的生殖系细胞中发现的内源性前病毒，除了少数例外，都是转录沉默的。

对多种哺乳类和鸟类动物的基因组仔细检测以后发现，这些动物的基因组中存在相当数量的内源性反转录病毒基因，大多数都是在很久以前的进化过程中，病毒感染生殖细胞以后的遗留物。在数百万年的过程中，这些遗留基因又经历了多次的突变，在这之后它们已经不能包装出有感染性的病毒颗粒了。但是在这其中有一小部分，特别是那些在最近的进化过程中插入的病毒基因，它们在结构上还相对完整。给予适当的刺激可以激活这些较为完整的病毒基因，它们包装出病毒颗粒，在细胞之间传播，最终导致机体发生某些恶变，尤其以造血系统为多（见 3.11 节）。举个例子来说，AKR 小鼠经常发生白血病就是因为机体中潜伏的前病毒经常自激活，引起小鼠发生病毒血症，通过插入突变激活癌基因，最终诱发白血病。

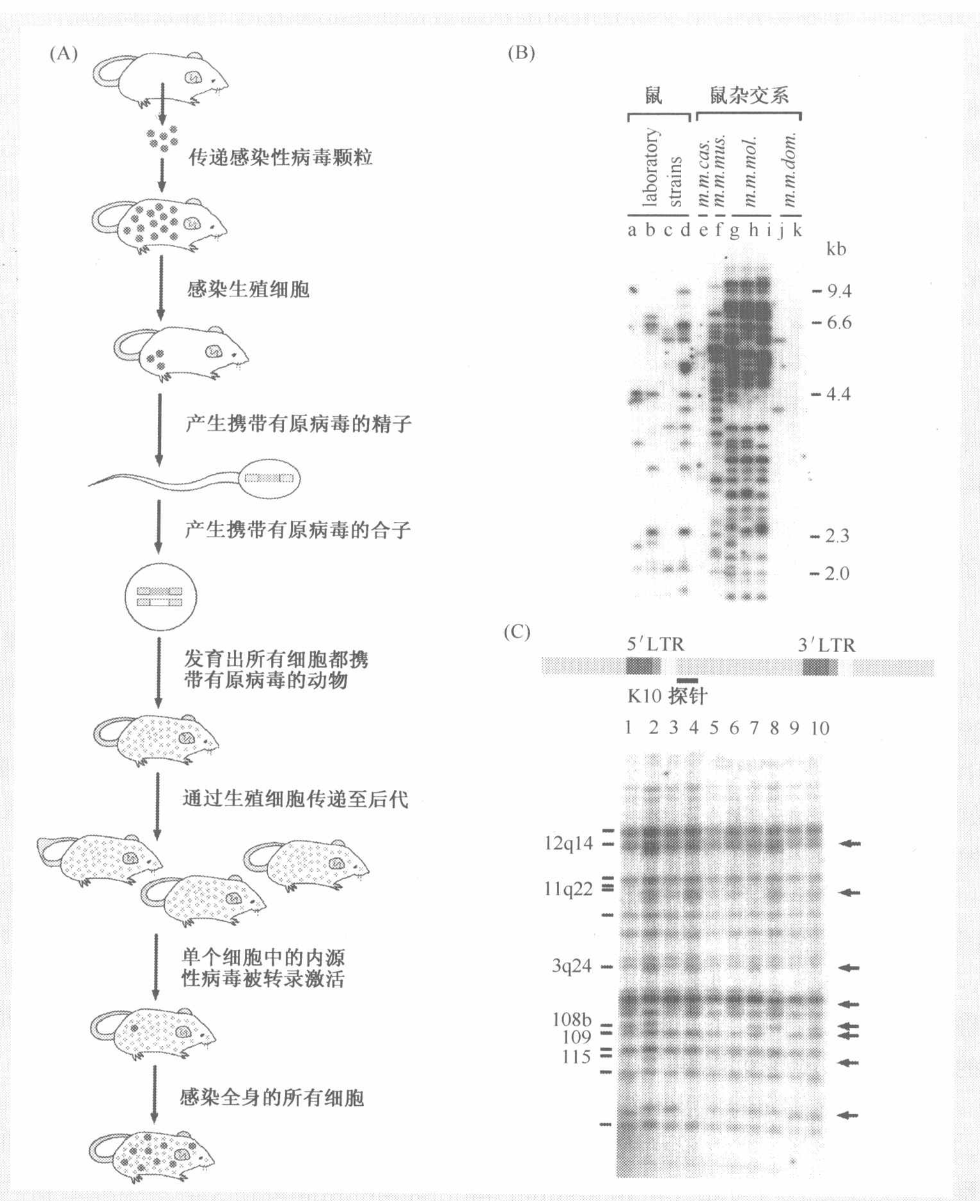


图 4.1　内源性反转录病毒的来源　(A) 这些病毒基因组最初产生于反转录病毒（红色点）感染动物（小鼠，顶部）后传播感染它们的精子或卵子。当前病毒（绿色长方形）整合到精子或卵子的基因组中后，它们会继续传递到受精卵的基因组中，然后分布到由这个受精卵发育而来的生物个体全身（绿色点）。这个个体又会通过有性繁殖将前病毒传递给它的后代。当这些动物体内的前病毒被激活以后，就有可能发生全身性的感染、病毒血症或者白血病。(B) 内源性反转录病毒(ERV) 基因组的存在可以通过检测感染动物的基因组来证实。这里显示的是通过 Southern 杂交检测出的 ERV 基因组（见图 4.4）。胶上每个泳道里的每一条带都代表那些带有 ERV 基因组的细胞基因组酶切片段。不同种系之间相异的 ERV 插入位点表明，这些种系最初的祖先被不止一个 ERV 整合到基因组中。(C) 相比小鼠 ERV 而言，人类不同人种之间的 ERV 插入位点更为相近，说明小鼠被 ERV 插入的时间比人类要早很多；那些多态性差异（黑色箭头）多是因为 ERV 前病毒末端 LTR 序列的重组，以及由此而导致的序列剪切。(B, from K. Tomonaga and J. M. Coffin, Virol. 73: 4327-4340, 1999; C, from J. F. Hughes and J. M. Coffin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 1668-1672, 2004.)

事实上，大多数存在于人类基因组中的内源反转录病毒基因，都是大约在500万年前早期灵长类动物生殖系细胞受到感染后遗存下来的。从那以后，这些前病毒的序列逐渐突变而不能产生感染性的病毒颗粒，慢慢地就变为那些大量存在于我们基因组中的垃圾序列的一部分。尽管来源于反转录病毒的序列占到人类基因组数量的8%，但在这大约4万条源于反转录病毒的序列中，只有很少的部分还具有相对完整的遗传特性和编码病毒的能力。其中一个相对较晚插入人类基因的病毒亚家族HERV-K，它的前病毒相对完整。但是即使是这样，到目前为止，人们依然没能在癌细胞中发现具有活性的HERV-K病毒颗粒（直到现在人们也不清楚，为什么人类的生殖系细胞在近期的进化中，基因组没有新的有功能的内源反转录病毒插入。但是在其他哺乳动物中，如小鼠，它们的基因组中在近期的进化中还有反转录病毒的插入，而且这些病毒序列相对完整并且具有生物学功能）。由于这些原因，癌症研究者开始在其他方向上寻找引发人类癌症的其他遗传因子。

4.2 检测非病毒癌基因的策略——转染

对那些坚持认为肿瘤发生起源于病毒以外因素的研究者，内源性反转录病毒理论崩溃以后留给了他们另外一种可能的理论。按照这个理论，致癌物都有着致突变的特性。不管是物理因素（如X射线）或化学因素（如烟焦油），这些物质可以通过突变易感细胞中关键的生长控制基因来诱发癌症。这些生长控制基因可能是某些正常的细胞基因，比如以前由反转录病毒学家发现的原癌基因。但这些基因突变以后，这些突变体就有可能发挥活化的癌基因的功能，诱导细胞癌变。

这种肿瘤发生模型认为，那些因为化学因素诱变的细胞带有突变的基因，这些突变基因导致细胞异常生长。估计细胞基因组中这些突变基因的数目基本上是不可能的。另外，通过实验来确实证明这些肿瘤基因的存在，也是一个巨大的挑战。如果这些突变基因确实存在于化学诱变的细胞中，如何去找到它们呢？如果这些基因是某些正常细胞基因的突变体，那么它们隐藏在成千上万的基因中，要找到它们可以说是大海捞针。

这些困难促使人们发展出新的实验策略，用以寻找恶性转化细胞中的癌基因。大致上，这种策略包括了将肿瘤细胞的DNA（或部分基因）导入正常的受体细胞当中然后观察受者细胞是否因为这样而发生转化。这个策略的实施依赖于几方面的实验技术进步，包括①有效的转染方法；②寻找到合适的肿瘤细胞以提取DNA；③寻找到合适的受体细胞（图4.2）。

1972年，一种新的高效基因转移方法产生了，这种方法被命名为**“转染”**（信息栏4.2）。这种方法同样也依赖于寻找到合适的受者细胞。从小鼠胚胎成纤维细胞培养来的NIH 3T3细胞系，被发现很适合摄取外源性DNA并将其整合到细胞基因组当中。

研究者们首先使用磷酸钙法将从肿瘤细胞中提取出的DNA转入NIH 3T3细胞当中。如果转入的DNA中含有癌基因，那么被转入的NIH 3T3细胞中会有一部分发生转化。转化的发生可以用NIH 3T3细胞被转入DNA后转化灶的产生来评估，这种方法以前被Howard Temin用来测算Rous肉瘤病毒转化鸡成纤维细胞（见4.2节）。

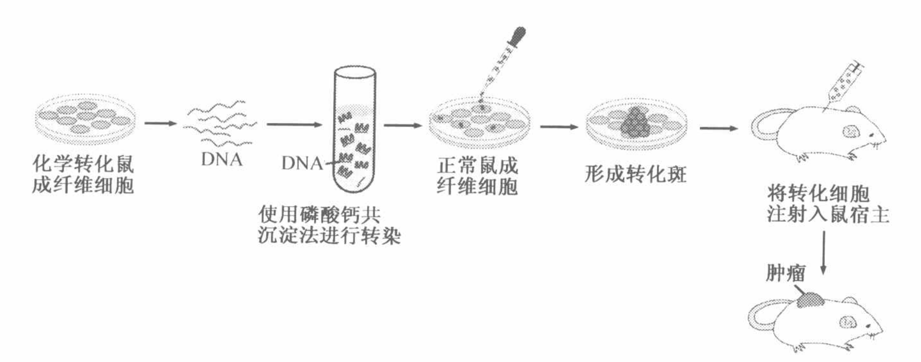


图 4.2 转染 转染可以用来检验癌细胞 DNA 中的癌基因。将从癌细胞（粉红色）中提取出来的 DNA 放入磷酸盐缓冲液中，然后加入钙离子，DNA 就会和磷酸钙形成共沉淀结晶（粉红色和紫色）。将结晶加入培养的细胞（绿色）当中。磷酸钙会促进细胞吸收 DNA。如果这些 DNA 当中含有癌基因，那么这些癌基因就有可能插入到受体细胞的基因组当中，促使这些细胞发生转化。发生转化的细胞以及分裂而来的子代会逐渐生长成肉眼可见的细胞团。将转化细胞注射入小鼠可以导致成瘤，并可由此来检查转化细胞的转化过程。

信息栏 4.2 转染是一种非常有用的基因转移技术 1972 年发展的转染方法是为了满足人们将单纯的病毒 RNA 或 DNA 直接导入细胞的需要。通过这种方法，人们可以不用病毒颗粒就把病毒基因组导入细胞。使用病毒颗粒转染会导致病毒复制，这样就很难与外源性病毒感染区分开。转染法可以将超过 20 000 碱基的 DNA 导入受者细胞中。稍后这种方法被改进，可以用来将细胞基因组转入受者细胞。

为了进行转染（图 4.2），首先要将纯化的 DNA 悬浮在磷酸盐缓冲液当中。然后加入钙离子，使 DNA 与磷酸钙共结晶沉淀。将共结晶沉淀加入到培养细胞当中，可以促使细胞摄取外源 DNA，关于这个机理至今还不明确。一旦 DNA 进入到受者细胞内以后，其中的一部分就能够进入到细胞核内，并且整合到细胞基因组当中和细胞本身的基因一起传递给子代细胞。除了磷酸钙法以外，还有其他很多转染方法被发明出来，但磷酸钙法仍被广泛应用。

在转染细胞之前还需要选择出合适的供者细胞，以便从中提取出 DNA。此时研究者们并不清楚自己该选择何种细胞。是否每一种癌细胞都携带有具有转化效力的基因，比如说像来源于 Rous 肉瘤病毒的 *src* 癌基因，并不是清楚地为人所知。同样，这些具有转化效力的细胞癌基因，是否能够在不同的胞内环境，是否能够在成纤维细胞当中发挥功能，也是未知的。另外还有其他种种的问题，例如，人类癌基因是否能够无视种间差异来转化小鼠细胞。

由于这些种种的考虑，研究者们选择了来源于小鼠成纤维细胞的肿瘤细胞作为供者细胞。这些供者肿瘤细胞产生于将 C3H10T1/2 小鼠成纤维细胞反复施以突变药物，3-甲基胆蒽（3-MC），一种来源于煤焦油的化学物。重要的是，这些供者肿瘤细胞不是由于外源病毒感染或者内源前病毒基因的激活而发生转化的。所以在这些细胞中检测到的癌基因，有非常大的可能性是细胞本身基因的突变体。

1978～1979 年的实验当中，NIH 3T3 细胞被转入从 3-MC 诱变细胞中提出 DNA 几个星期以后，人们观察到了大量转化灶的产生。在随后的实验中人们观察到，从转化

灶中提取出的细胞具有悬浮生长的能力和致瘤能力。这样一个简单的实验，证明了供者DNA当中，含有恶性转化正常NIH 3T3细胞的遗传因子。

从正常C3H10T1/2细胞中提取出来的DNA就不具有使NIH 3T3细胞产生转化灶的能力。这说明3-MC的确使C3H10T1/2细胞的基因组发生了某些改变，而产生了具有转化能力的一些新遗传序列。换句话说，3-MC将正常的C3H10T1/2细胞基因转变为突变体，这些突变基因在导入NIH 3T3细胞后作为癌基因来发挥作用。

起初人们很难说到底是供者细胞DNA中的一个癌基因还是几个癌基因一起，来使受体细胞发生转化。后来人们发现，在转染实验中，只有约0.1%的供者DNA能够整合到受体细胞的基因组当中。也就是说两个遗传上独立的基因同时转染出现在单个受者细胞基因组当中的概率是千分之一乘以千分之一，也就是百万分之一。根据这个计算的结果，研究者们认为，使受者NIH 3T3细胞产生转化的是单个供者癌基因。这个结果也同样证明了人们以前使用3-MC诱变C3H10T1/2细胞，实际上是使其中某一个基因突变而使细胞癌变。

这个转染实验非常重要，因为它证明了细胞癌基因的产生可以与病毒感染无关。人类肿瘤细胞可能也类似于此，可能来源于与病毒无关的途径，同样也携带有可供转染使用的癌基因。那么，人类癌基因，如果的确存在于某些肿瘤细胞基因组当中，是否具有转化小鼠细胞的能力？

这些问题很快就得到了肯定的回答。从人类癌细胞分离出的DNA，被确证可以转化受体NIH 3T3细胞（图4.3）。这说明，来源于这些细胞中的癌基因，可以超越种间差异和组织差异，使细胞发生转化。

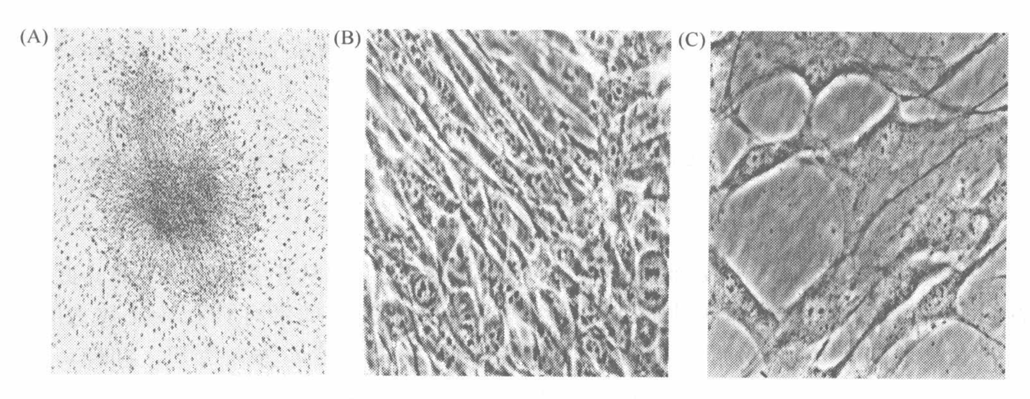


图4.3 使用人类肿瘤DNA转化小鼠细胞 通过转染法将不同肿瘤细胞来源的DNA导入到小鼠细胞中，引起小鼠细胞产生转化灶。（A）转染来自T24人膀胱癌DNA引起的转化灶。（B）从该转化灶分离培养的细胞高倍显微镜下的照片，细胞相互重叠生长，形状呈纺锤形。（C）转化灶周围的未转化NIH 3T3细胞。和其他正常成纤维细胞一样，胞质宽而延展，彼此也没有重叠生长。（From M. Perucho et al.，Cell 27：467-476，1981.）

4.3 人类肿瘤中发现的癌基因和反转录病毒有关

通过上述转染法检测到的细胞癌基因，从表面上看是来源于没有致癌能力的正常细

胞基因，似乎并没有反转录病毒的参与（3.9 节）。在内源病毒的产生过程中，那些本来属于正常细胞基因的原癌基因通过不同的机制被激活。

人们对此有一个疑问：同样的细胞原癌基因，是否既可以在当时的情况下被侵入的反转录病毒激活，又可以在另一种情况下被非病毒因素激活？或者是说，被反转录病毒激活的癌基因和被非病毒因素激活的癌基因原本就是不同的两组基因。

使用特异性检测反转录病毒相关癌基因的 DNA 探针，人们得到了答案。使用 Southern 杂交（图 4.4），根据 Harvey 大鼠肉瘤病毒中的 H-*ras* 癌基因序列设计的 DNA 探针，人们检测到了人膀胱癌相关的癌基因（图 4.5）。而一个源于 Kirsten 肉瘤病毒的 K-*ras* 基因，同样能够在人结肠癌细胞中检测到。

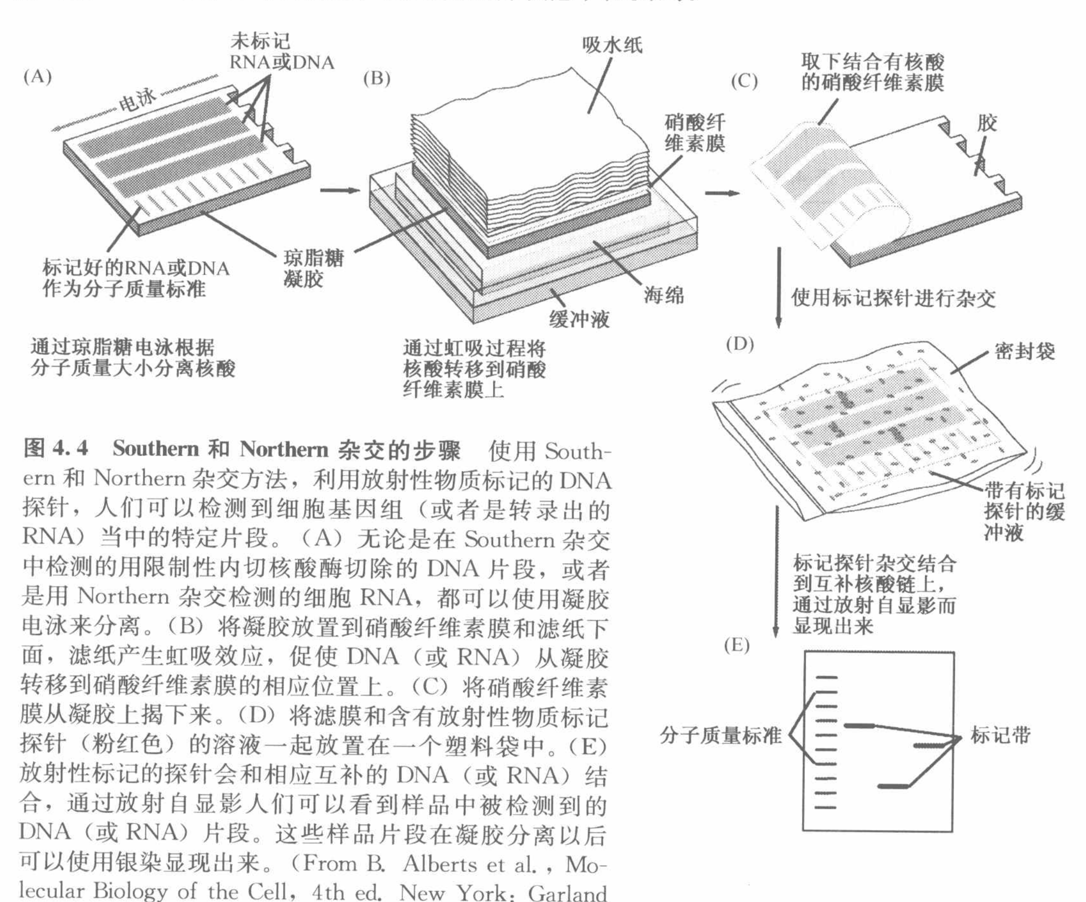


图 4.4 Southern 和 Northern 杂交的步骤 使用 Southern 和 Northern 杂交方法，利用放射性物质标记的 DNA 探针，人们可以检测到细胞基因组（或者是转录出的 RNA）当中的特定片段。(A) 无论是在 Southern 杂交中检测的用限制性内切核酸酶切除的 DNA 片段，或者是用 Northern 杂交检测的细胞 RNA，都可以使用凝胶电泳来分离。(B) 将凝胶放置到硝酸纤维素膜和滤纸下面，滤纸产生虹吸效应，促使 DNA（或 RNA）从凝胶转移到硝酸纤维素膜的相应位置上。(C) 将硝酸纤维素膜从凝胶上揭下来。(D) 将滤膜和含有放射性物质标记探针（粉红色）的溶液一起放置在一个塑料袋中。(E) 放射性标记的探针会和相应互补的 DNA（或 RNA）结合，通过放射自显影人们可以看到样品中被检测到的 DNA（或 RNA）片段。这些样品片段在凝胶分离以后可以使用银染显现出来。(From B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

人们越来越多地发现，很多非病毒因素诱变产生肿瘤中的癌基因和反转录病毒相关癌基因之间有联系（表 4.1）。在这种联系被发现以后，人们随即发现这些反转录病毒相关癌基因在肿瘤基因组中有更多的拷贝数。来源于鸟类白血病病毒（AMV；3.10 节）的 *myc* 癌基因，被发现在人类前髓细胞性白血病细胞系，HL-60 细胞的 DNA 当中存在多个拷贝。这些多余的拷贝是 DNA 复制产生的，并相应引起翻译蛋白的增加，在某种程度上促进细胞的增殖。在鸟成红细胞增多症病毒（AEV；表 3.3）中发现的 *erbB*

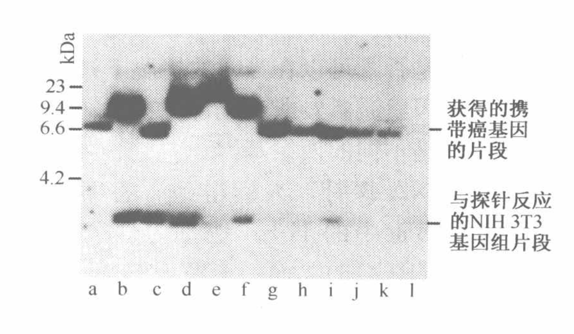


图 4.5 转染的细胞癌基因和反转录病毒癌基因具有同源性 Southern 杂交（图 4.4）被用于检测反转录病毒癌基因和转染用细胞癌基因之间的同源性。从反转录病毒癌基因克隆出的 DNA 片段在放射性标记以后被作为探针，细胞基因组 DNA 被提取出来以后使用限制性内切核酸酶切断以后，使用 Southern 杂交来检测。本图检测的是 H-*ras* 基因，a～k 泳道是从被人膀胱癌基因组 DNA 转染转化的 NIH 3T3 细胞中提取出来的 DNA 样品，l 泳道是正常未转染的 NIH 3T3 细胞。(From L. F. Parada et al., Nature 297：474-478，1982.)

基因，被发现在人胃癌、乳腺癌和脑瘤细胞中有多拷贝。现在人们发现，*erbB* 基因在大多数人类肿瘤发生中表达升高。

表 4.1 在各种人类肿瘤中发现的反转录病毒相关癌基因

病毒名称	种属	癌基因	癌蛋白种类	发现癌基因的人类肿瘤
劳氏肉瘤	鸡	*src*	受体类酪氨酸激酶	结肠癌[a]
Abelson 白血病	鼠	*abl*	非受体类酪氨酸激酶	慢性髓细胞性白血病
鸟成红细胞增多症	鼠	*erbB*	受体类酪氨酸激酶	胃癌、肺癌、乳腺癌[b]
Mcdonough 猫肉瘤	猫	*fms*	受体类酪氨酸激酶	急性髓细胞性白血病[c]
H-Z 猫	猫	*kit*	受体类酪氨酸激酶[d]	胃肠间质癌
鼠肉瘤 3611	鼠	*raf*	丝氨酸/苏氨酸激酶[e]	膀胱癌
类人猿肉瘤	猴子	*sis*	生长因子（PDGF）	多种癌[f]
Harvey 肉瘤	鼠/猫	*H-ras*[g]	小 G 蛋白	膀胱癌
Kristen 肉瘤	鼠/猫	*K-ras*[g]	小 G 蛋白	多种癌
鸟成红细胞增多症	鸡	*erbA*	核受体[h]	肝癌，肾癌，脑垂体癌
鸟成髓细胞白血病 E26	鸡	*ets*	转录因子	白血球过多症[i]
鸟髓细胞瘤	鸡	*myc*[j]	转录因子	多种癌
网状内皮组织增殖症	火鸡	*rel*[k]	转录因子	淋巴瘤

a 在这些肿瘤当中只发现了少量突变。

b EGF 受体；相关的 erbB2/HER2/Neu 蛋白在 30%的乳腺癌中过表达。

c Fms，集落生长因子（CSF-1）受体，在急性髓细胞性白血病有少量突变；相关 Fit3（Fms 样酪氨酸激酶-3）蛋白在白血病中多有突变。

d 干细胞受体。

e 近亲的 B-Raf 蛋白在大多数黑色素瘤存在突变。

f 在多种肿瘤中有过表达。

g 相关的 *N-ras* 基因在多种肿瘤中被发现有突变。

h 甲状腺激素受体。

i 人类 Ets 转录因子家族有 27 个成员。Ets-1 在多种肿瘤中有过表达的情况，其他在急性髓细胞性白血病和 Ewing肉瘤中有染色体转位的现象。

j 相关的 *N-myc* 基因儿童神经母细胞瘤和小细胞肺癌中有过表达。

k Rel 是构成 NF-κB 的蛋白之一，它在多种肿瘤中发生激活。

缩写：AML，急性髓细胞性白血病；CML，慢性髓细胞性白血病。

部分改编自 J. Butel，Carcinogenesis 21：405-426，2000；and G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston and London：Jones and Bartlett，1995.

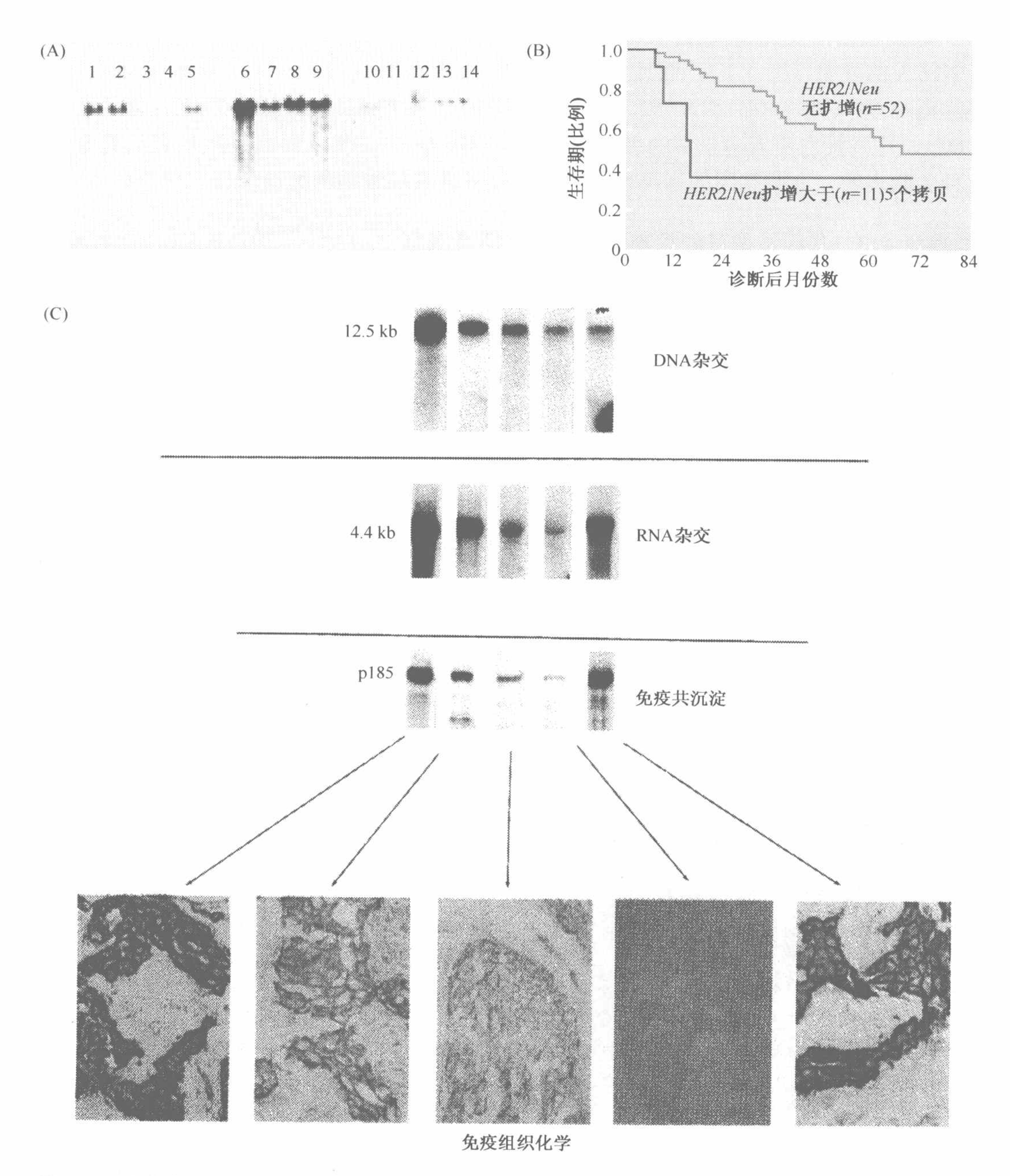


图 4.6 乳腺癌中 *erbB2/neu* 基因的扩增 （A）Southern 杂交被用来检测人乳腺癌细胞是否具有 *erbB2/neu* 基因多拷贝的现象（*erbB2/neu* 又被称为 *HER2*）。黑色条带是限制性内切核酸酶酶切产生的片段，结果显示有些人乳腺癌病例具有 *erbB2/neu* 基因多拷贝的现象。（B）这种多拷贝的发生与患者较差的预后相关，拷贝数超过 5 个的患者与没有多拷贝的患者相比，诊治 18 个月以后更容易复发。（C）进一步的工作显示，在有些肿瘤当中具有 *erbB2/neu* 多拷贝的现象，有些肿瘤没有多拷贝但是依然具有 *erbB2/neu* 转录升高的现象，有些肿瘤即使上述两样都没有，但是依然具有 *erbB2/neu* 蛋白水平上升的现象。*erbB2/neu* 蛋白水平的变化可以使用免疫组化的方法来检测。（A and B，from D. J. Slamon et al.，Science 235：177-182，1987；C，courtesy of D. J. Slamon.）

1987 年，一些和 *erbB* 有关的基因，如 *erbB2*、*neu* 或 *HER2*，被发现在乳腺癌中有多拷贝的现象（图 4.6），而且在单个细胞中的拷贝数超过 5 个的与肿瘤患者的生存率降低有关（图 4.6B）。*erbB2*/*HER2* 的拷贝增加使相应的蛋白质表达增加（图 4.6C）。这些蛋白质表达正常的患者半数生存期限为 6～7 年，而高表达患者只有 3 年。这种关联表明，这些基因的拷贝增加可能会促进乳腺癌细胞的恶性生长（信息栏 4.3）。

信息栏 4.3　基因扩增可能很难解释细胞的恶性表型　*erbB2*/*neu*/*HER2* 在约 30%的人类乳腺癌中存在扩增，而且该扩增与预后差有关系（图 4.6），该发现看起来可以解释乳腺癌的恶性表型。已经知道该蛋白质能够使细胞进入无限生长周期，避免凋亡。但是，基因表达谱的分析产生了更为复杂的解释。图 4.7 所示 17q 染色体上 *ERBB2* 基因两侧 160 个基因在 360 个人类乳腺癌中的表达情况，红色表示基因表达升高，绿色表示基因表达正常。显然，大约有 1/4 的乳腺癌 *erbB2*/*neu*/*HER2* 基因表达升高，正如我们从扩增情况中预期的。与此同时，与该基因紧密连锁的一些基因的表达水平也明显升高，反映了这些基因属于一个共同的**扩增子**，与相邻的基因共扩增。这些基因中有几个也能够影响细胞的增殖和存活，包括 *GRB7* 和 *PPARB*，它们编码的蛋白质与 *ErbB2* 存在相互作用（第 5 章）。因此，在这种情况下，可能一些共同扩增的基因协同起作用，很难确切地把细胞的恶性表型与单一的基因（如这里讨论的 *erbB2*/*neu*/*HER2*）联系起来。

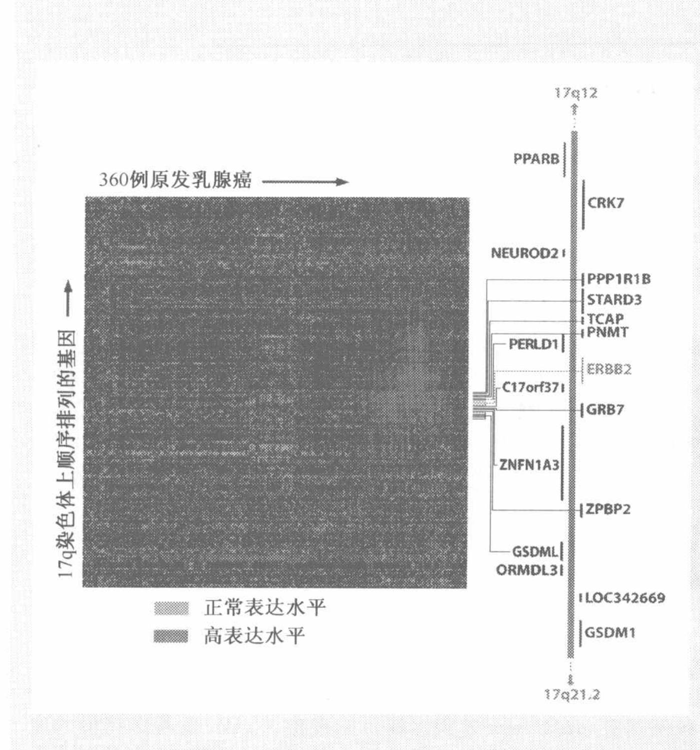


图 4.7　随着 *HER2*/*neu*/*erbB2* 的表达升高，一些染色体 17q 上的基因也表达上升　有一些基因的扩增，如 *HER2*/*neu* /*erbB2*，通常是染色体上一大段扩增的结果，这些扩增的染色体片段被称为扩增子，包括扩增的基因和两侧数百万个碱基。因为扩增子中还包含有其他的基因，这些基因的扩增也会影响肿瘤细胞的表型（在此使用乳腺癌细胞作为例子）。在本图中，*HER2*/*neu*/*erbB2* 两侧的基因在右侧用红色竖条来表示。本例图中左侧的竖栏代表从 360 例乳腺癌中提取到的 RNA 的分析结果，针对 160 个不同基因的探针以相应基因在人染色体 17q 上的位置，从上到下依次排列。具有类似情况的肿瘤使用计算机聚类分析，结果显示在很多肿瘤中，*HER2* 两侧的基因都会随着它的表达升高而增加。(Courtesy of L. D. Miller.)

具有讽刺意义的是，*src* 癌基因，这个第一个被发现的细胞癌基因，却难以在肿瘤基因组中找到其突变体。直到 *src* 被克隆 25 年后的 1999 年，人们才确证在约 12%的晚期结肠癌中存在 *src* 的突变体。

所有这些事情表明，很多与反转录病毒相关的癌基因在人类肿瘤细胞当中都可以找到其突变体。这也表明，这些细胞原癌基因在癌症发生的过程当中，既可以被反转录病毒激活，也可以被非病毒因素激活。

4.4 引起蛋白表达或结构变化的遗传改变都可能激活原癌基因

在研究者发现很多原癌基因都能被激活的时候，引起它们激活的遗传改变却依然不是很清楚。由反转录病毒引起癌变的机理，在反转录病毒的基因组结构被研究清楚以后，人们也就清楚了。在正常细胞中，原癌基因的表达是由其启动子来控制的。启动子能够调节这些基因随着机体生理状况的改变而改变表达。通常细胞会根据自身需要，通过相应信号通路使原癌基因处于相对表达较低的水平；有些时候，也会因为细胞的需要，诱导原癌基因高表达。

当细胞被反转录病毒感染后又会出现另一种完全不同的情况。当反转录病毒基因插入到细胞基因组中后，插入基因的表达是受反转录病毒的启动子控制的（图 3.19），该基因的表达会处于不可停止的高表达状态。这个插入的基因是不会受细胞本身信号通路的调控的。例如，c-*myc* 基因，它的表达或**阻抑**一般严格受细胞外信号水平的控制，如受 MGF 的控制（第 5 章会有讨论）。但是存在于鸟白血病病毒（AMV）基因组中的 *myc* 基因，v-*myc* 的表达，总是处于一个持续的高水平上。

问题是，人基因组中原本正常的原癌基因 H-*ras* 基因是怎样变成一个癌基因的呢？基因扩增的理论不能用来解释，因为在人膀胱癌细胞基因组中，研究者检测到该基因只有一个拷贝。当 H-*ras* 从人膀胱癌细胞中被克隆分离（信息栏 4.4）出来以后，这个疑问就存在了。在基因组中，它是一个长 6600 碱基对的片段。令人兴奋的是，在人正常细胞基因组中也有一个同样大小的片段。正常细胞中的这个片段就是 H-*ras* 原癌基因，在膀胱癌发生的过程中，该基因发生了突变而变成一个癌基因。

信息栏 4.4 克隆转染的癌基因 在没有发现人膀胱癌细胞株 T24/EJ 中的癌基因与 H-*ras* 有关系之前，曾经有两个研究组对其进行克隆。他们共同面临的困难是：关于这个癌基因的序列结构一无所知。其中一组将人膀胱癌 DNA 转入 NIH 3T3 小鼠细胞中（图 4.8）。用 Southern 杂交的方法，利用 Alu 序列特异探针来检测供者 DNA，**Alu 序列**在人类基因组中有超过百万个的拷贝，但是在小鼠基因组中没有 Alu 序列（更准确的说法是，小鼠基因组中的重复序列不会被 Alu 序列特异探针识别）。在人类基因组中，Alu 序列平均 5kb 就有一个。所以，在转染后，有很大可能癌基因及其周围的 Alu 序列会共同转入细胞中。

研究者在被转染转化的细胞中发现了一小部分的 Alu 序列（约占人基因组中 Alu 序列总数的 0.1%）。他们再从被转化的 NIH 3T3 小鼠细胞中提取出基因组 DNA，然后在此使用这些 DNA 转染 NIH 3T3 细胞，第二次被转化的细胞被分离用以提取 DNA。只有约 0.1%的供者 DNA 能够被转入到受体细胞（图 4.8）。在这一轮转染中产生的转化细胞含有的 Alu 序列肯定是紧连癌基因的。研究者们使用 Alu 序列特异探针，用 Southern 杂交的方法检测第二轮转染转化的细胞，然后将这段序列克隆下来，克隆出来含有 Alu 序列的片段就带有人膀胱癌癌基因。

另一组研究者采用的方法是在第一轮转染当中，将膀胱癌基因与细菌基因连接起来。然后在第二轮转染转化以后用针对细菌基因的探针将癌基因检测克隆出来。

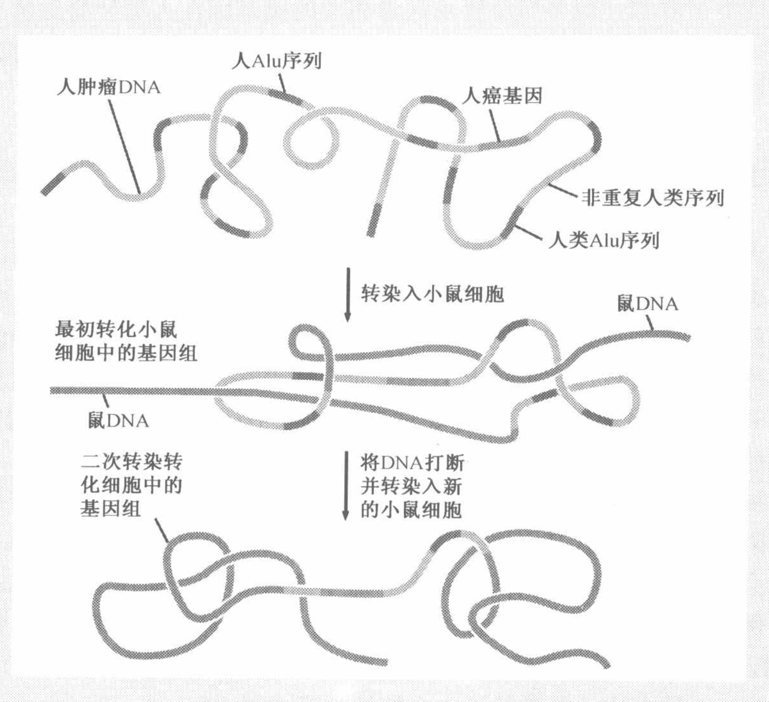


图 4.8 克隆转染进的人类癌基因 克隆人膀胱癌癌基因的方法是利用癌细胞基因组上的 Alu 序列（红色片段），Alu 序列在人类基因组（橙色片段）中有超过百万个的拷贝。所以，几乎所有的人类基因都与至少一个 Alu 序列相连。如果包含有人类癌基因的肿瘤细胞基因组 DNA 被转染入小鼠细胞，插入的人类 DNA 就可以用 Southern 杂交的方法，利用 Alu 序列特异探针来从小鼠 DNA（棕色条带）中检测出来（图 4.4）。因为转入的人类 DNA 当中可能有多个 Alu 序列，所以人们从转化细胞中提取出来，然后酶切成片段，然后再将酶切片段转染小鼠细胞。在这一轮转染中产生的转化细胞含有的 Alu 序列肯定是紧连癌基因的。所以我们可以用这一次的转化细胞的 DNA 来构建基因组文库，利用 Alu 序列特异探针来克隆癌基因。

尽管在 DNA 结构上非常相近，但 H-*ras* 基因的这两个版本却发挥着完全不同的作用。从人膀胱癌中分离出来的版本具有促使 NIH 3T3 细胞转化的能力，而另一个版本则没有这个能力。解答这个疑问需要更为精确的基因作图，从酶切图谱上看，两者并无不同。现在研究者们已经清楚，这两个版本的 H-*ras* 在序列上有所不同。通过将这两个版本的基因杂交，再进行转染转化实验，研究者定位了差异序列的所在（图 4.9）。最后这个差异序列被局限在 350 个碱基对的片段里。

通过序列分析，这个长 350 个碱基对的片段里具体的差异之处也被找到。这仅仅是一个很细微的差异，即原癌基因中的 G 突变为癌基因中的 T。这一个碱基对的突变——**点突变**，就是将 H-*ras* 原癌基因变为诱发肿瘤的癌基因的原因（图 4.10）。这个结果几乎同时在三个不同的实验室中发现，结果是真实无疑的。这个发现是癌基因研究中的一个里程碑，人们首次找到这样一个引起肿瘤恶性生长的基因突变。同样重要的是，研究者发现，这是一个体细胞突变。

有了这个结果，研究者可以找到一个解释膀胱癌或其他癌症发生的理论。最早克隆

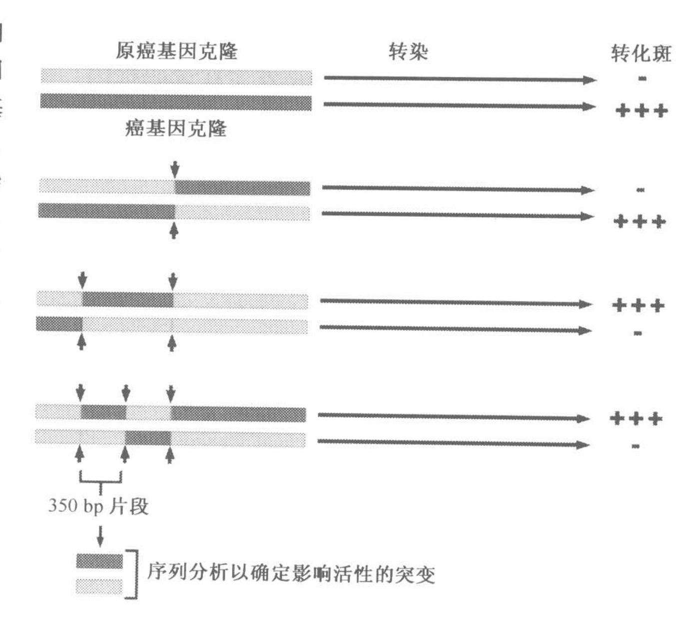


图 4.9　癌基因中具有激活作用突变的位置　把人膀胱癌癌基因（红色片段）和近缘的人 H-*ras* 基因酶切（竖箭头所指位置）后，再将酶切片段相互连接重组成杂交 DNA，使用杂交 DNA 来转染，通过转化灶的形成（图 4.2）以检测杂交 DNA 的转化活性。这样，研究者可以逐步将癌基因中包含激活作用突变的 350 个碱基对片段定位下来。而后这段序列将会被分析，研究者可以得知具体的突变位点。(From C. J. Tabin et al., Nature 300: 143-149, 1982.)

CCCGGG CCGCAGGCCC TTGAGGAGCG

gly ─原癌基因

met thr glu tyr lys leu val val val gly ala GGC gly val gly lys ser ala leu thr
ATG ACG GAA TAT AAG CTG GTG GTG GTG GGC GCC GTC GGT GTG GGC AAG AGT GCG CTG ACC

val ─癌基因

断点

ile gln leu ile gln asn his phe val asp glu tyr asp pro thr ile glu
ATC CAG CTG ATC CAG AAC CAT TTT GTG GAC GAA TAC GAC CCC ACT ATA GAG GTGAGCCTGC

GCCGCCGTCC AGGTGCCAGC AGCTGCTGCG GGCGAGCCCA GGACACAGCC AGGATAGGGC TGGCTGCAGC

CCCTGGTCCC CTGCATGGTG CTGTGGCCCT GTCTCCTGCT TCCTCTAGAG GAGGGGAGTC CCTCGTCTCA

GCACCCCAGG AGAGGAGGGG GCATGAGGGG CATGAGAGGT ACC

图 4.10　H-*ras* 基因中具有激活作用的位点　在图 4.9 中曾提到，人膀胱癌癌基因和原癌基因的差别位于一个长 350 碱基对的片段中。分别将癌基因和原癌基因的这 350 碱基对的片段进行测序，发现突变的单碱基改变了 H-*ras* 编码的第 12 个氨基酸（箭头所指），将原癌基因编码的甘氨酸变成了缬氨酸。(From C. J. Tabin et al., Nature 300:143-149,1982.)

到 H-*ras* 癌基因的膀胱癌标本来源于一个中年男性患者，他有 40 年的吸烟史。在这期间，吸烟产生的致癌物，被吸收到他的肺里，然后经过血液循环通过肾从尿里排泄出去。有些致癌物会进入到膀胱细胞中，接触到基因组 DNA，引起 H-*ras* 的突变。突变细胞和它的子代不受控制的生长增殖，数年之后就会形成一个可诊断到的肿瘤。

重要的是，发生碱基突变的位置位于编码蛋白的 H-*ras* **可读框**内（图 4.10）。这个突变将原癌基因编码的甘氨酸变成了癌基因编码的缬氨酸。氨基酸变化引起 H-*ras* 功能的变化将在第 5 章和第 6 章中讨论。

H-*ras* 突变的情况又和 *myc* 基因不一样。H-*ras* 是因为编码蛋白的改变而引起癌基因的激活，*myc* 则是由于表达水平的失调而产生致癌效力的。在 10 年中，有很多肿瘤

被发现带有点突变的三个 *ras* 基因成员中的一个，这三个 *ras* 成员分别是 H-*ras*、K-*ras* 和 N-*ras*。而且，这些点突变都是发生在读码框内。所以，由 H-*ras*、K-*ras* 和 N-*ras* 癌基因编码的癌蛋白带有在 12、61 或 13 位的氨基酸置换。总的来说，超过 20%的肿瘤组织都带有 *ras* 基因的点突变（表 4.2）。

表 4.2　多种人类肿瘤中携带的 *ras* 癌基因点突变

肿瘤种类	带有 *ras* 点突变的肿瘤比率[a]/%
胰腺癌	90 K
甲状腺（乳头状瘤）	60（H，K，N）
甲状腺（滤泡瘤）	55（H，K，N）
结肠	45（K）
精原细胞瘤	45（K，N）
脊髓发育不良	45（N，K）
肺癌（非小细胞）	35（K）
急性髓细胞性白血病	30（N）
肝癌	30（N）
黑色素瘤	15（K）
膀胱癌	10（K）
肾癌	10（H）

a H、K 和 N 指的是 *H-RAS*、*K-RAS* 和 *N-RAS* 基因。

改编自 J. Downward，Nat. Rev. Cancer 3：11-22，2003.

结构变化和转录表达改变也会一起促进癌基因的产生。如鸟白血病病毒基因组中的 *myc* 基因，其表达受病毒启动子控制而高表达。同时 *myc* 的读码框也发生改变，引起其编码蛋白的结构改变，进一步加强其致癌能力。类似的如 H-*ras* 基因，带有点突变，同时在反转录病毒启动子的作用下，表达也会大大上升。

4.5　*myc* 癌基因可以通过至少三种不同的机制而起作用

鸟白血病病毒（AMV）中的 v-*myc* 癌基因在大多数情况下是通过去调节引起的高表达而起作用的，一些研究提示可能还会通过其他不同的机制来起作用。在 4.3 节中曾经提到，在某些人类肿瘤中，*myc* 癌基因由自身的启动子驱动，但是肿瘤基因组中 *myc* 的拷贝数远超过正常细胞中两个拷贝的情况。在约 30%的儿童神经母细胞瘤病例中，c-*myc* 的近亲 N-*myc*，被检测到有基因扩增的现象，尤其在一些恶性度较高的病例中特别明显（信息栏 4.5）。基因拷贝数的增加意味着相应表达蛋白水平的增加。我们会在后面的第 8 章中讨论，Myc 家族的蛋白具有促进细胞生长增殖的作用。所以当 Myc 蛋白表达超量时，它会使细胞不受控制的生长（图 4.11）。

信息栏 4.5 N-*myc* 基因扩增和儿童神经母细胞瘤 超过 40%的晚期儿童神经母细胞瘤存在 N-*myc* 基因扩增的现象。基因扩增的现象可能是产生同质染色区段（HSR）或者双微体（DM），通常意味着较差的预后。同质染色区段（HSR）包含有 N-*myc* 基因的片段，一般都不在 N-*myc* 基因正常存在的位置，而是和其他至少 18 个不同的染色体片段相连。N-*myc* 基因的多拷贝数目并不是连续变化的，而是有两个集中的区域，某些肿瘤有 10～30 个拷贝，某些肿瘤有 100～150 个拷贝。N-*myc* 基因的扩增是神经母细胞瘤的一个特征，在神经外胚层发生的肿瘤里也有这样的现象，如星形细胞瘤和视神经母细胞瘤。另外在小细胞肺癌中这种有神经内分泌特点的肿瘤中，也有这种现象的存在。

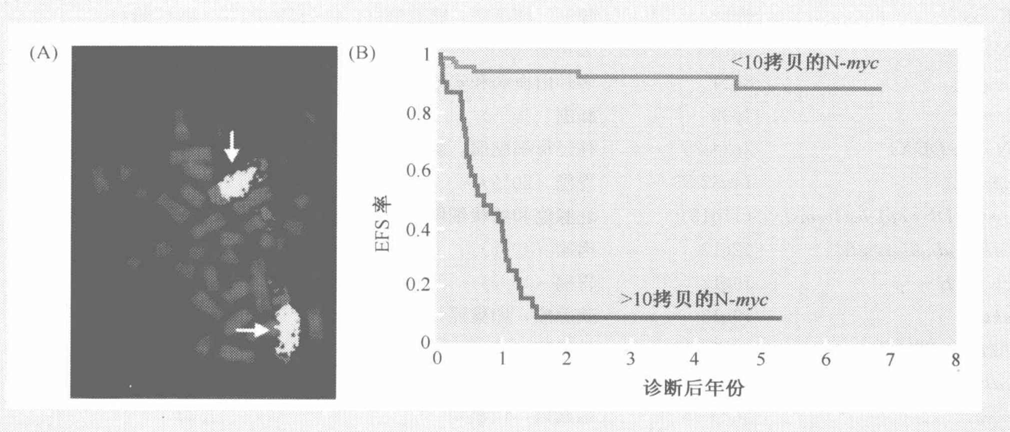


图 4.11 N-*myc* 基因的扩增和神经母细胞瘤的预后 （A）N-*myc* 基因在儿童神经母细胞瘤中经常发生扩增。使用 FISH（荧光原位杂交）检测到 N-*myc* 的多个拷贝（黄色）。这些多拷贝在染色体上呈串联排列，说明它们构成了同质染色区段（HSR），而不是在肿瘤中也很常见的双微体（DM）。（B）较少 N-*myc* 基因拷贝数的患者具有较好的生存率和预后，而 N-*myc* 基因多拷贝患者预后较差、生存时间较短。（A，from C. Lengauer et al.，Nature 396：643-649，1998；B，from M. L. Schmidt et al.，J. Clin. Oncol. 18：1260-1268，2000.）

我们在这里另加说明的是，非人类来源的癌基因通常写成斜体的三个字母（如 *myc*），而其蛋白质产物首个字母大写（如 Myc）。原癌基因 *myc* 通常被称为 c-*myc*，以区别它的两个近亲，N-*myc* 和 L-*myc*。而人类的 *myc* 基因一般被写为 *MYC*，其蛋白质产物被写为 MYC。在本书中，一般采用非人类癌基因的写法来描述所有的癌基因。

引起 *myc* 基因拷贝数增加的基因扩增，是由一个特定区段的染色体 DNA 复制而造成的（图 4.7）。这个扩增的特定染色体片段——扩增子，远远大于 c-*myc* 或 N-*myc* 的长度（通常包含 50 万～1000 万碱基对），所以在细胞分裂中期时，可以用光学显微镜看到这个扩增的片段。基因扩增会产生一些重复的长线性染色体区段，其在显微镜下表现为同质染色区（HSR）（图 1.12）。但带有 *myc* 或 N-*myc* 的染色体片段，有可能从染色体上断裂下来，形成一些染色体外的独立重复颗粒（双微体；图 1.12）。今天，研究人员已经知道在多种人类肿瘤中都存在不同癌基因的扩增现象（表 4.3）。

表 4.3　经常发生扩增的染色体区域及其携带的基因

癌基因名称[a]	人类染色体上的位置	人类癌症	蛋白性质
erbB1	7q12-13	恶性胶质瘤（50%）；鳞状细胞癌（10%～20%）	RTK
cab1-erbB2-grb7	17q12	胃癌，卵巢癌，乳腺癌（10%～25%）	RTK，衔接蛋白
k-sam	7q26	胃癌，乳腺癌（10%～20%）	RTK
FGF-R1	8p12	乳腺癌（10%）	RTK
met	7q31	胃癌（20%）	RTK
K-ras	6p12	肺癌，卵巢癌，膀胱癌（5%～15%）	小 G 蛋白
N-ras	1p13	头颈癌（30%）	TF
c-myc	8q24	多种白血病和实体瘤（10%～50%）	TF
L-myc	1p32	肺癌（10%）	TF
N-myc-DDX1	2p24-25	神经母细胞瘤，肺癌（30%）	TF
akt-1	14q32-33	胃癌（20%）	丝氨酸/苏氨酸激酶
cyclin D1-exp1-hst1-ems1	(11q13)	乳腺癌和鳞状细胞癌（40%～50%）	G1 cyclin
cdk4-mdm2-sas-gli	12q13	肉瘤（40%）	CDK，p53 拮抗分子
cyclin E	19q12	胃癌（15%）	cyclin
akt2	19q13	胰腺癌，卵巢癌（30%）	丝氨酸/苏氨酸激酶
A1B1，*BTAK*	20q12-13	乳腺瘤（15%）	受体共激活物
cdk6	19q21-22	胶质瘤（5%）	CDK
myb	6q23-24	结肠癌，白血病	TF
ets-1	11q23	淋巴瘤	TF
gli	12q13	恶性胶质瘤	TF
FGFR2	10q26	乳腺癌	RTK

a 该表列出的是那些与其连锁基因高频率共扩增的基因，只有发生频率最高的基因的蛋白产物被列在右栏中。

简写：RTK 受体酪氨酸激酶；TF 转录因子；CDK cyclin-dependent kinase（激酶）；TK 酪氨酸激酶。

感谢 M. Terada，Tokyo，改编自 G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston and London：Jones and Bartlett，1995.

在 3.11 节中曾经描述过另一种少见的情况，当 ALV 插入到基因组 DNA 接近 *c-myc* 原癌基因的位置时，*c-myc* 的转录会受到 ALV 的调控，引起过量的 *myc* RNA 和蛋白质表达，给予细胞过量的生长信号。

前病毒插入引起 *c-myc* 原癌基因激活的情况使研究者们想到，即使 *c-myc* 处于染色体上正常的位置，它也有可能在外源启动子插入时参与肿瘤的发生。在伯基特淋巴瘤中，就发生了这种情况。这种肿瘤常见于中东非的儿童患者（图 4.12）。病因学研究表明，该肿瘤的发生源于疟原虫感染和疱疹病毒（EBV）慢性感染。

但无论疟原虫感染或疱疹病毒慢性感染，都无法直接归为引起肿瘤细胞恶性生长的原因。仔细分析分裂中期的肿瘤细胞基因组，研究者发现几乎所有的伯基特淋巴瘤细胞都有染色体**易位**的情况发生（图 2.23 也有所示）。也就是说，某一染色体上的片段和另一无关染色体上的片段融合（图 4.13）。这种易位的发生是相互的，例如，当染色体 A 上的一个片段转位到染色体 B 上，被替换出的染色体 B 上的片段也会连接到染色体 A 上。在伯基特淋巴瘤细胞中，研究者发现，细胞内人类染色体 2 或 14 或 22 分别发生了转位，8 号染色体上的一个片段可能和三者中的一个易位。

1983 年，研究者发现，8 号染色体上的 *myc* 原癌基因可能参与到伯基特淋巴瘤中

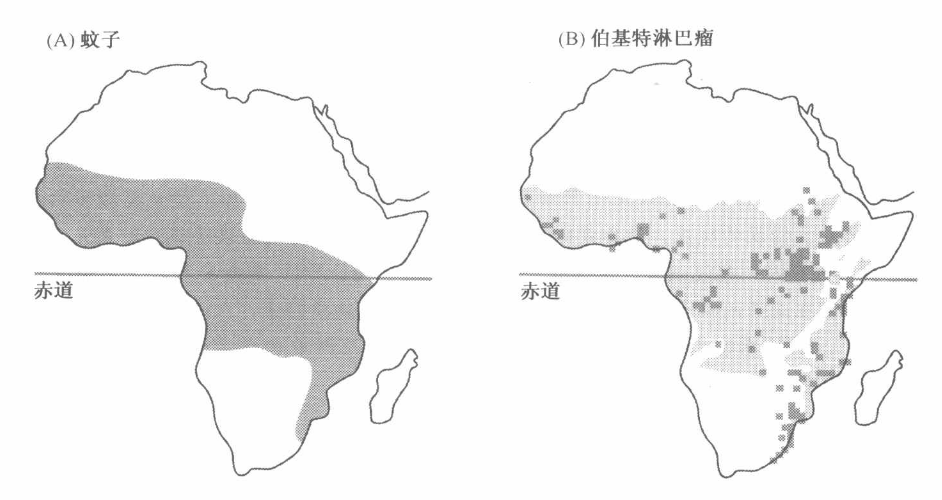


图 4.12　发生在非洲的伯基特淋巴瘤　（A）一种传递疟疾的蚊虫 *Aedes simpsoni* 在非洲的分布图。（B）伯基特淋巴瘤儿童患者在非洲的分布图。由于二者分布基本一致，所以推断疟疾可能是伯基特淋巴瘤的病因。而伯基特淋巴瘤基因组中可以检测到疱疹病毒（EBV）基因的存在，又提示了另一种可能的病因。[A and B, from A. J. Haddow, in D. P. Burkitt and D. H. Wright (eds.), Burkitt's Lymphoma. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone Co. and Baltimore: Williams and Wilkins.]

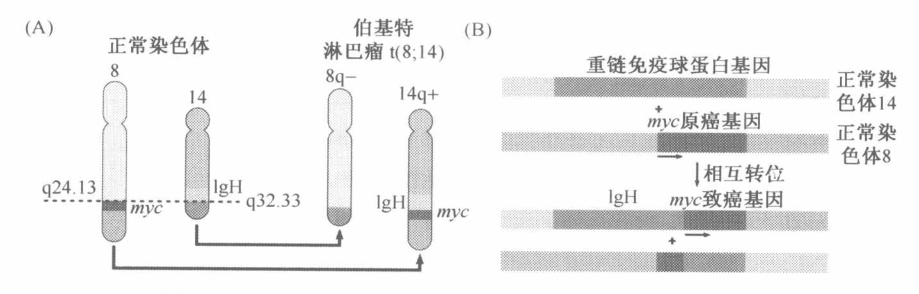


图 4.13　伯基特淋巴瘤中的染色体转位　（A）伯基特淋巴瘤中 c-*myc* 基因的表达受免疫球蛋白基因启动子的调控，这是由于伯基特淋巴瘤中发生了染色体易位的现象。染色体 2 或 14 或 22 分别发生了转位，其中的某一个和 8 号染色体上的一个片段易位（发生的比率为 κ 链：9%，λ 链：16%，重链：75%）。最常见的转位，t（8：14），在本图举例说明。（B）以遗传图谱的方式来描述 8 号染色体上的 c-*myc* 基因（红色长方形）受 14 号染色体上的免疫球蛋白基因（IgH；灰色长方形）启动子的控制。因为免疫球蛋白基因启动子转录驱动能力强，所以 *myc* 基因的结构没有变化，但转录翻译的蛋白产物却持续处于一个不正常的高水平。随后发生的 *myc* 读码框内的点突变加剧了 Myc 的癌蛋白功能。(From P. Leder et al., Science 222: 765-771, 1983.)

发生的染色体转位。在易位点（也称为染色体**断裂点**）的另一面是**免疫球蛋白**的启动子，所以，*myc* 基因的表达受到免疫球蛋白启动子的调控。参与的分别是 14 号染色体上的免疫球蛋白重链，2 号染色体上的轻链，或者是 22 号染色体上的 λ 免疫球蛋白轻链（在进化中负责重排免疫球蛋白基因的酶，偶然失去特异性，使免疫球蛋白基因与

myc 重排在一起）。但 EBV 所起的作用仍然没有得到解释（信息栏 4.6）。

信息栏 4.6　EB 疱疹病毒是如何引起癌症发生的　1982 年发现的伯基特淋巴瘤中存在基因转位的现象，启示研究者们关于 EB 疱疹病毒和疟原虫感染引发伯基特淋巴瘤的机制，虽然具体的发生机制仍然不是很清楚。疟原虫慢性感染会削弱儿童的抵抗力，使他们容易被 EBV 感染，并由此产生大量因 EBV 而产生的永生化 B 细胞的聚集。在这些细胞中，原本使免疫球蛋白基因正确排列的酶，会发生错误的反应，使免疫球蛋白基因与 *c-myc* 原癌基因错误连接。结果是，产生的癌基因 *myc* 和其他基因一起使细胞过度增殖，最终形成淋巴瘤。EBV 在南亚人群中引起鼻咽癌的原因也是一个谜，在南亚的病毒感染人群同时还有一些其他的致癌因素，比如爱吃腌鱼。更让人不解的是，在西方，EBV 感染是很常见的，即使在免疫正常的人群中也通常会引起单核细胞增多症，但却很少引发恶性肿瘤。

突然有一天，人们发现了这个复杂的染色体变化的机制，原来非常简单：当 *myc* 基因与具有强转录驱动能力的免疫球蛋白启动子重排在一起以后（图 4.13），*myc* 基因就变为了一个癌基因，驱动淋巴细胞恶性增殖，超过其他正常的淋巴细胞。在这个发现以后，研究者又发现了多种不同的染色体重排（表 4.4），多数这些重排的基因还没有特别清楚。目前已有超过 300 种不同情况的染色体易位（发生在不同的癌症病例中）被研究归类，目前为止已有超过 100 个易位产生的新基因被克隆出来。

表 4.4　人类肿瘤中基因易位形成的癌基因

癌基因	癌
myc	伯金氏淋巴瘤，或其他 B 细胞瘤，T 细胞瘤
bcl-2	滤泡状 B 细胞淋巴瘤
bcl-3	慢性 B 细胞淋巴瘤
bcl-6	弥散性 B 细胞淋巴瘤
hox1	急性 T 细胞淋巴瘤
lyl	急性 T 细胞淋巴瘤
rhom-1	急性 T 细胞淋巴瘤
rhom-2	急性 T 细胞淋巴瘤
tal-1	急性 T 细胞淋巴瘤
tal-2	急性 T 细胞淋巴瘤
tal-7	急性 T 细胞淋巴瘤

改编自 G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston and London：Jones and Bartlett，1995.

简而言之，*c-myc* 原癌基因有三种不同的激活方式：前病毒插入、基因扩增或染色体转位。三种情况下，*c-myc* 失去了其正常功能而处于一个持续的高表达状态。当然，癌症中基因高表达的机制研究得还不是很透彻。某些高表达的情况，是由于基因扩增或者染色体转位，但是更多的情况是，这些基因并未发生异变，只是由于调节它们的信号通路异常，才引起它们的高表达。还有很多这种情况的病例没有得到研究。而且，那些发生扩增的基因也不总是高表达的（信息栏 4.7），这也暗示，基因扩增并不一定在肿瘤发生中起关键作用。

信息栏 4.7　基因扩增不总是引起表达升高　近来对肿瘤细胞的基因组进行系统分析，并对相同区段的基因表达水平进行分析，研究者们发现基因的拷贝数并不总是与其表达水平有关。发生基因扩增的目标中，只有40%～60%的基因有相应的表达水平上升。这说明，很多基因都存在负反馈调节，这保证了这些基因在生理状态下行使正常功能，即使这个基因有多余的拷贝。这些负反馈调节通常是通过调节转录因子的活性来起作用，所以某些基因的过表达是由于转录因子调控的失灵或基因启动子的改变引起的。

4.6　蛋白结构的变化也会引起癌基因的激活

在 *ras* 基因中发现的点突变，是类似的原癌基因点突变中第一个被发现的，这种突变改变了原癌蛋白的结构，引起原癌基因的激活。在胃癌、乳腺癌和脑恶性胶质瘤的发生中，都有表皮生长因子（EGF）**受体**的参与。在下一章中，我们会对它进行详细的描述，该受体是一个跨膜受体，跨越了胞膜到胞浆的区域。EGF 受体和其他 60 个类似的受体一样，在识别到胞外的**配体**（EGF）存在后，将信号传到相应的胞内通路。在大约 1/3 的脑恶性胶质瘤病例中，EGF 受体丢失了大部分胞外区域（图 4.14）。研究者现在知道，这种切断了的受体会持续传递生长刺激信号到胞内，即使此时胞外没有 EGF 的存在。这种切断了的 EGF 受体起着癌蛋白的作用，驱动细胞恶性增殖。在第 5 章中，我们会更为细致地描述生长因子受体突变为癌蛋白时的结构变化。

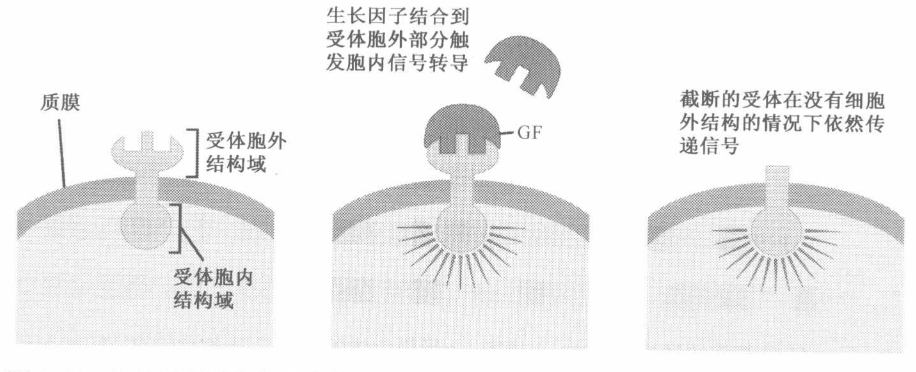


图 4.14　生长因子受体的异常激活　通常存在于细胞表面的生长因子受体，只会在胞外存在其配体——生长因子时，才会向胞内传递信号。但当其胞外区域由于编码基因突变或 mRNA 异常剪切而缺失时，剪切后的受体即使在胞外没有任何配体的情况下也会持续发出生长信号。

超过 95%的慢性**髓细胞**性白血病带有一种不同于伯基特淋巴瘤中的基因转位。与伯基特淋巴瘤的基因转位不一样的是，这种基因转位后产生了一个新的更大的读码框，编码一个融合蛋白（图 2.23）。其中一部分读码框来自于 *abl* 原癌基因，发现于 Abelson 鼠白血病病毒（表 3.3）。*abl* 原癌基因存在于染色体 9q34 上，在很多肿瘤中都与染色体 22q11 上的一段序列融合（图 4.15）［这种融合的标准写法为 t（9；22）（q34；q11），t 代表转位，q 代表染色体长臂，p 代表染色体短臂］。22 号染色体上的这个区域被称为断点集簇区（breakpoint cluster region），简写为 *bcr*。这些断点都被发现存在于

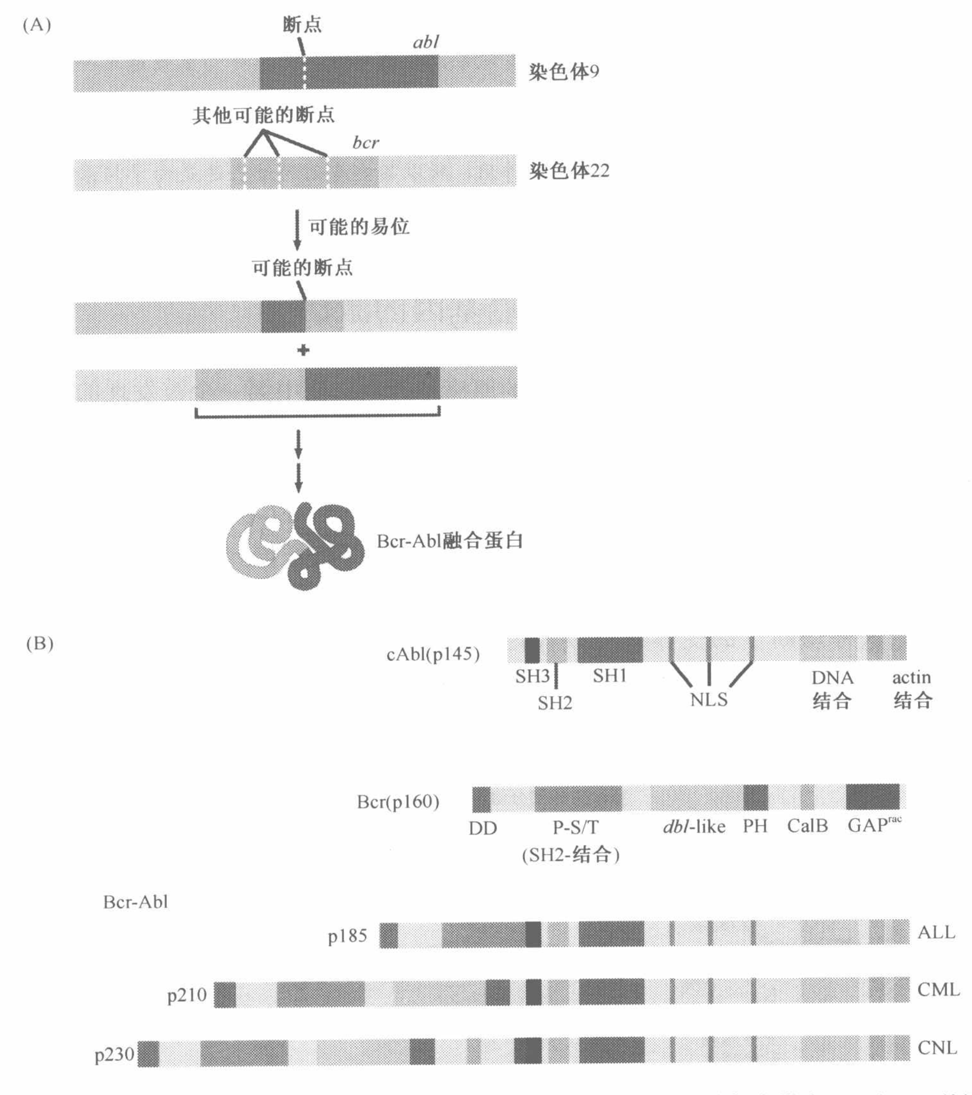


图 4.15 *bcr-abl* 癌基因的形成 （A）9 号和 22 号染色体的转位，其各自带有 *abl* 和 *bcr* 基因，转位后形成一个融合基因，编码融合蛋白 Bcr-Abl。（B）此图所示，在不同的白血病病例中，*bcr* 转位时的断点不一样。ALL，急性淋巴细胞性白血病；CML，慢性髓细胞性白血病；CNL，慢性中性粒细胞性白血病。（蛋白编码的正确结构如顶部所示）。cAbl 和 Bcr 各自的结构域采用不同的颜色标记，当二者形成融合蛋白后，融合产物具有多种信号活性。（B，adapted from A. M. Pendergast，in A. M. Carella，Chronic Myeloid Leukaemia：Biology and Treatment. London：Martin Dunitz，2001.）

bcr 旁边。Abl 和 Bcr 融合蛋白调节 Abl 蛋白，发出持续的生长信号。

bcr-abl 被发现以后，又有数个产生融合蛋白的基因转位被发现（表 4.5）。几乎所有的这些情况都是在血液病中发现的，尤其是白血病和淋巴瘤。但由于带有基因转位的病例被发现的还并不是很多，很多融合蛋白的功能还不是很清楚。

表 4.5　人类肿瘤中染色体易位形成的具有新功能新结构的融合癌蛋白

癌基因	癌
bcr/abl	慢性髓细胞性白血病；急性淋巴细胞性白血病
dek/can	急性髓细胞样白血病
E2A/pbx1	急性前 B 细胞白血病
PML/RAR	急性早幼粒细胞性白血病
？/*erg*	髓细胞样白血病
irel/urg	B 细胞淋巴瘤
CBFβ/MYH11	急性髓细胞样白血病
aml1/mtg8	急性髓细胞样白血病
ews/fli	Ewing 肉瘤
lyt-10/Cα1	B 细胞淋巴瘤
hrx/enl	急性白血病
hrx/af4	急性白血病
NPM/ALK	大细胞淋巴瘤

改编自 G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston and London：Jones and Bartlett，1995.

4.7　总结与展望

20 世纪 70 年代后期，研究者将各种关于癌基因的研究结果逐渐进行归纳。研究者公认，在哺乳类动物和鸟类基因组中，含有一大类被称为原癌基因的基因，它们起调节正常细胞生长与分化的作用。与这类基因有关的改变，会改变基因的表达或者其蛋白质结构，继而导致细胞内发生过量的生长刺激信号，这时这一类基因就表现为癌细胞中的癌基因。一旦其转变为癌基因，即在癌变过程中起关键的作用，驱动细胞生长增殖。

很多这类基因的发现，是由于在具有转化能力的反转录病毒基因组中存在它们的序列，如在 Rous 肉瘤病毒中。接着，研究者又通过转染实验，发现了肿瘤细胞中，因为接触致癌因素或自发突变而产生的具有转化细胞能力的基因。这些肿瘤细胞并没有反转录病毒的感染。但是，这些肿瘤细胞中的癌基因与反转录病毒中的基因还是有关联的。这意味着，这类基因可以通过两种方式被激活：体细胞突变或反转录病毒感染。

体细胞突变有两种情况：一种是导致基因编码的蛋白结构的改变；另一种是蛋白质表达水平的高表达。蛋白质结构的改变包括点突变，如 *ras* 基因；基因转位，如 *bcr-abl*。蛋白质表达水平的上升，是由于基因拷贝数的扩增或基因转位导致转录调控的变化，如 *myc* 基因转位后受免疫球蛋白基因启动子的控制。

这些突变基因的作用曾不为人所知，因为研究者们早期研究总是发现癌症的发生与病毒或细菌等感染因素有关。在表 4.6 中，列举了与病毒感染有关的肿瘤 ，其中一些是很常见的肿瘤。全世界超过 1/4 的癌症死亡病例中，癌症的发生都与感染因素相关。全世界胃癌死亡患者中的 9%都有长期的幽门螺旋杆菌感染。几乎所有的肝癌发生，都与乙肝、丙肝感染有关。5%的宫颈癌死亡患者都有人乳头瘤病毒（HPV）感染。

表 4.6　参与人类癌症发生的病毒

病毒[a]	病毒家族	感染细胞	癌症	传播途径
EBV	疱疹病毒	B 细胞	伯金氏肉瘤	唾液
		口咽上皮细胞	鼻咽癌	
		淋巴结	淋巴瘤[b]	霍奇金病
HTLV-1	反转录病毒	T 细胞	非霍奇金淋巴瘤	亲子；性传播[c]
HHV-8[d]	疱疹病毒	内皮细胞	卡波济氏肉瘤；体腔淋巴瘤	性传播
HBV	肝 DNA 病毒	肝细胞	肝癌	亲子；性传播
HCV	黄病毒	肝细胞	肝癌	亲子
HPV	乳头瘤病毒	宫颈上皮细胞	宫颈癌	性传播
JCV[e]	多瘤病毒	中枢神经系统	星形细胞瘤；成胶质瘤	?

a 大多数这些病毒的基因组中都带有生长促进基因或癌基因。但在 HBV 和 HCV 病毒的基因组中并没有找到这样的基因。

b 在免疫力低下的患者的肿瘤细胞中带有多个 EBV 病毒基因组拷贝。

c 亲子传播，经血液传播；性传播，经性交传播。

d 又被称作 KSHV，卡波济氏肉瘤疱疹病毒。

e 超过 75%的人群在 15 岁以前就感染了 CV（SV40 的近亲），但仅偶发肿瘤。该病毒被证明与肿瘤的发生有关，但是否是肿瘤发生的起因还不得而知。

部分改编自 J. Butel，Carcinogenesis 21：405-426，2000.

无论如何，正如我们在这章中讲述到的，这些感染诱发肿瘤机制和细胞癌基因诱发机制一起构成了肿瘤发生的机制。在某些病例中，病毒感染将病毒癌基因导入细胞内引起细胞转化，如疱疹病毒。而另外一些病毒，如乙肝病毒、丙肝病毒，它们导致癌症的原因就不是那么直接了。第 11 章中会讲到这一点，因为这一类病毒并不带有癌基因，它们是通过引起的慢性组织损伤和炎症反应而诱发癌症的。

我们会在接下来的两章中具体讲述体细胞突变是如何诱发癌症的。最初，研究者认为细胞癌基因的发现已经足以解释肿瘤的发生和生长。但是，很快就发现，细胞癌基因的存在只能对肿瘤发生和生长中的一部分做出解释，另外一些遗传因素也的确参与肿瘤细胞的恶性生长。了解癌蛋白质对细胞生长的具体作用通路，对理解细胞恶性生长的原因也是至关重要的。所以，细胞癌基因的发现虽然重要，但仅仅是个重要的开始。要透彻理解肿瘤发生的病变过程，还需要将来长时间的深入研究。

重要概念

- 在 20 世纪 70 年代的研究中，研究者在大多数肿瘤病例中都没有找到“肿瘤病毒”，所以他们总结出一个用以解释大多数肿瘤发生原因的理论：致癌因子发挥致突变作用，突变正常的生长控制基因为癌基因。
- 为了验证发生癌变的细胞是否带有从正常基因突变而来的癌基因，研究者发展了一种新的实验方法：将用化学物质诱变转化细胞中的 DNA 提取出来，转入正常细胞中，然后监测被转入细胞是否发生转化。
- 从化学物质诱变转化的细胞中提出 DNA 转入 NIH 3T3 细胞几个星期后，人们观察到了大量转化灶的产生。在随后的实验中人们观察到，从转化灶当中提取出的细胞

具有悬浮生长的能力和致肿瘤的能力。证明了化学物质诱变转化的细胞的 DNA 中，含有恶性转化正常 NIH 3T3 细胞的癌基因，这些癌基因的存在不依赖于病毒的感染。

- 进一步从人类细胞提取 DNA 转化啮齿类动物细胞的实验，显示癌基因转化细胞的能力可以跨越种系和组织差别。
- 通过转染方法发现的细胞癌基因和反转录病毒基因组中具有转化效力的癌基因，都与正常细胞中存在的正常细胞基因相关。DNA 杂交实验证明这些正常基因在结构上是上述两类癌基因结构的前体。所以很多最早从反转录病毒中发现的癌基因，可以在突变的肿瘤细胞基因组中找到相应版本。
- 反转录病毒相关癌基因常被发现在肿瘤细胞基因组中出现拷贝数过量增加的现象，意味着相应基因翻译蛋白的增加，促进细胞的增殖。比如 *erbB2*/*neu*/*HER2* 在乳腺癌中的拷贝数增加，意味着较差的预后，说明其促进了肿瘤细胞的生长。反转录病毒相关癌基因在其表达受反转录病毒启动子控制时，转录表达不受控制的升高。但正常细胞中的原癌基因是如何变化为癌基因的，又是一个需要研究的问题。
- 对癌基因 H-*ras* 进行序列分析，发现它与相应的原癌基因只相差一个碱基，导致翻译出的蛋白质发生了氨基酸的变化，造成功能异常。
- H-*ras* 的点突变证明，癌基因的激活可能是由于基因编码翻译蛋白质结构的改变。
- 癌基因激活的两种机制，转录调节的改变和编码产物结构的改变，可以协同作用激活癌基因。
- *myc* 癌基因的激活有多种机制参与：前病毒基因组的整合掺入、基因拷贝扩增和染色体转位。
- 基因拷贝数的增加可由一个特定区段的染色体 DNA 复制造成。这个扩增的特定染色体片段——扩增子，在细胞分裂中期时可以用光学显微镜看到这个扩增的片段。基因扩增会产生一些重复的长线性染色体区段在显微镜下表现为同质染色区（HSR）。但发生基因扩增的染色体片段可能从染色体上断裂下来，形成一些染色体外的独立重复颗粒（双微体）。但是基因的扩增不一定会使编码翻译产物的水平上升。
- 基因转位发生在一个染色体和另一个染色体之间，转位后，一个基因会处于一个异源启动子的控制之下，产生过表达，如伯基特淋巴瘤中的 *myc* 基因。在这些肿瘤中，免疫球蛋白基因的启动子转位到 8 号染色体 *myc* 原癌基因的前面，替代其原有的正常启动子，使 *myc* 发生高表达。
- 很多蛋白结构的改变，结果都是癌基因的激活。比如生长因子受体结构的改变，和融合蛋白 Bcr-Abl，这些改变都会造成过量的生长信号。

思考问题

1. 在本章中，我们列举了什么证据证明内源性反转录病毒基因组没有在某些癌症的发生中起作用？
2. 为什么某些癌基因不能用监测转化斑一类的实验来检测？
3. 染色体基因扩增的机制是什么？

4. 原癌基因转变为癌基因的机制有哪些？
5. 染色体转位激活原癌基因的机制有哪些？
6. 要找到脊椎动物细胞中所有的癌基因，你会采用什么样的策略来检测细胞基因组？
7. 原癌基因有可能引发肿瘤，那么，为什么在动物进化中，原癌基因没有从细胞基因组中消失呢？

参考读物

Alitalo K and Schwab M (1986) Oncogene amplification in tumor cells. *Adv. Cancer Res.* 47, 235–281.

Barbacid M (1987) *ras* genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779–827.

Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235–248.

Bos JL (1989) *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.

Brodeur G (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 203–216.

Butel J. (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21, 405–426.

Cleary ML (1991) Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 66, 619–622.

Cooper GM (1995) Oncogenes, 2nd ed. Boston and London: Jones and Bartlett.

Lowy DR & Willumsen BM (1993) Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851–891.

Martin GS (2001) The hunting of the Src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 467–475.

Mitelman F, Johansson B & Mertens F (eds) (2004) Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman

Rabbitts TH (1991) Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641–644.

Reddy EP, Skalka AM & Curran T (eds) (1988) The Oncogene Handbook. Amsterdam: Elsevier.

Rosenberg N & Jolicoeur P (1997) Retroviral pathogenesis. In Retroviruses (JM Coffin, SH Hughes, HE Varmus eds), pp 475–585. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rowley JD (2001) Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer* 1, 245–250.

Solomon E, Borrow J & Goddard AD (1991) Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1153–1160.

（刘芝华　王跃锜）

第 5 章　生长因子、受体与癌症

某些胚胎血清具有刺激细胞生长的能力，而已转化的细胞则对这些刺激细胞生长的因子需求降低，这些现象皆可能基于这样一个事实，即这些存在于血清中的因子与某些胚胎或肿瘤细胞合成的转化因子相同或相似。

David E. Comings，遗传学家，1973 年

癌基因及其前体——原癌基因的发现促使人们提出了一系列问题，其中居于核心地位的问题是，癌基因到底如何通过作用于它们所编码的蛋白质，如此成功地扰乱了细胞的行为。癌蛋白如 Src 和 Ras ——癌基因 *src* 和 *ras* 的产物，可同时改变多种细胞的表型，一类单独的蛋白质，是如何同时改变如此众多不同的信号调节通路的呢？

癌蛋白作用机制的重要线索来源于对“正常细胞如何调节其生长及分化”的系统研究。正常细胞从其周围获得生长刺激信号，这些信号被细胞中复杂的信号环路处理并整合，而这一环路决定着细胞是否适合生长及分化。

细胞表面需要接受胞外信号并将之传递入胞内，一个极具挑战性的生化问题由此诞生：细胞内外的空间被细胞膜——一种脂质双层分隔开来，它可以有效拦截几乎所有分子的运动（仅某些极小的分子除外），导致胞膜两侧许多分子（包括离子）的浓度显著不同。细胞是如何解决通过一张几乎不通透的膜**转导**信号这一难题的呢？既然有这层屏障的存在，细胞内部又是如何感知其外周组织正在发生些什么的呢（图 5.1）？

细胞如何对这些信号进行处理仅仅是细胞间通讯这一问题中的一小部分。该问题的解决需要追溯到 6000 万～7000 万年以前，那时第一个多细胞生物（原虫）出现了。如果没有一种有效的胞间通讯方式，单个细胞间无法相互协调，而形成结构复杂的组织及有机体则更是难以想象。显然，细胞间通讯的建立需要一些细胞具有发放信号的能力，而另一些细胞具有接收并以某种特殊方式产生应答的能力。

细胞间信号的传递在很大程度上由蛋白质负责。因此，信号的发放需要某些细胞能够将蛋白质释放至胞外空间。这种释放，即蛋白质的分泌，由于细胞膜的不通透性而同样复杂。这些信号蛋白被释放至胞外空间后，受体细胞必须可以感受到它们的存在，本章主要围绕着第二个问题展开，即正常细胞到底是如何从其周围环境中接受信号的。我们即将看到，癌细胞形成的主要原因是细胞信号调节的紊乱。

5.1　正常后生动物细胞间生命活动相互依存

前文提到（4.6 节），细胞接受并处理生化信号从而调节细胞增生，正常的癌基因编码蛋白质常常是这一机制的组成部分。因此，为了能够真正理解癌基因及癌蛋白作用的复杂性，我们需要掌握正常细胞如何调控增殖这一问题。

我们对该问题的探讨始于这样一个基本并具广泛意义的原则，即正常组织形态的维持由以下几方面构成：保持不同细胞组分的适宜比例；替代缺失细胞；清除额外的，无

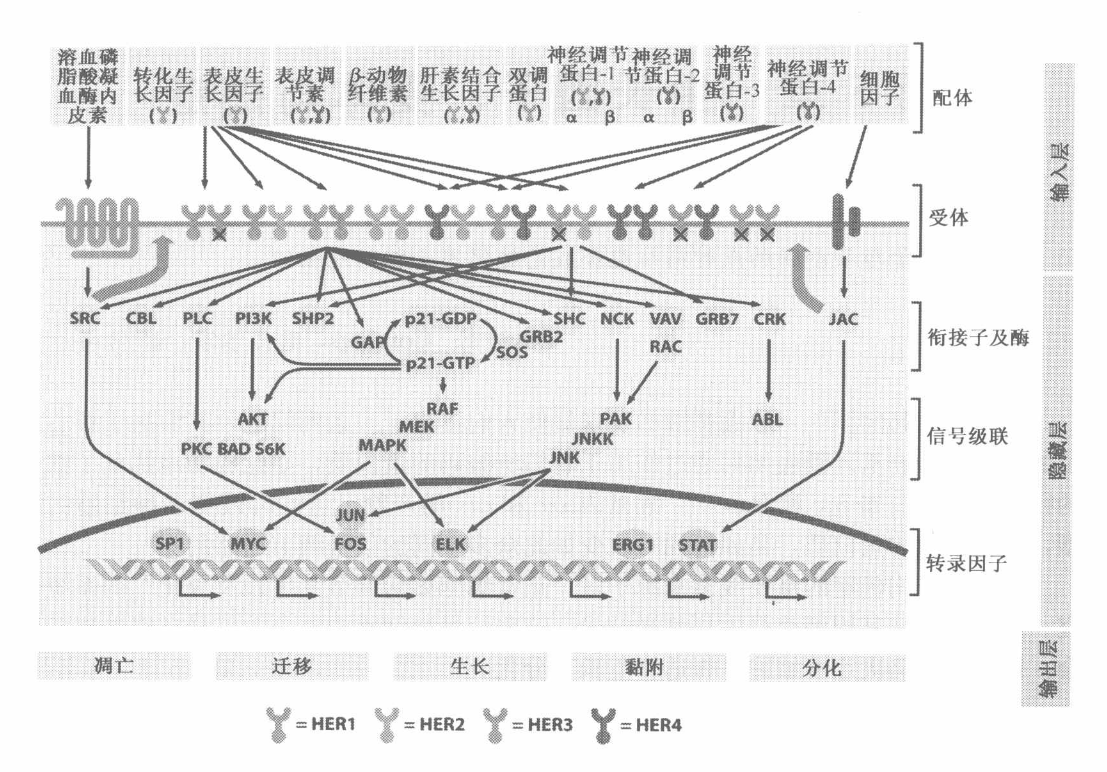


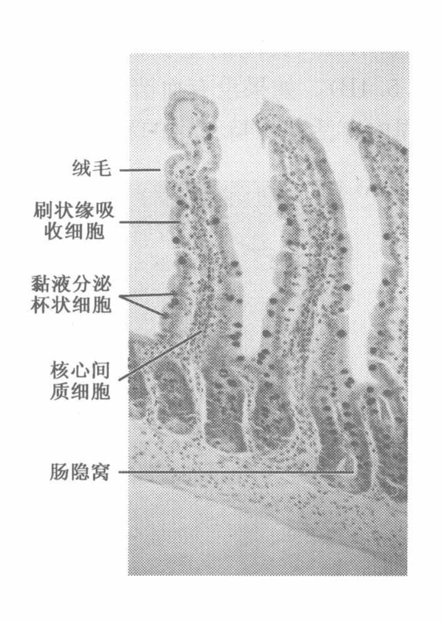
图 5.1 ErbB 信号网络：细胞如何与其周围环境进行沟通 此图是细胞如何与之周围环境相沟通的一个表现。正如这里所显示的，大量蛋白质信使（配体，顶部绿色区域）与细胞表面一系列复杂的受体相互作用，经由细胞膜（灰色）向胞质内传递信号。在胞质中，一个复杂的蛋白质信号转导网络对这些信号进行处理，并将信号送至细胞核（底部）内，最终促发一系列生物反应（输出层，底部黄色矩形区）。这一环路的许多组分，包括在细胞表面和细胞内部的，都与癌症发病机制相关。此图主要聚焦于呈现在哺乳动物细胞表面的一小部分受体——本章的主题。有关胞内接头蛋白和信号瀑布的问题将在下一章中描述（From Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2：127-137，2001）。

用细胞（图 5.2）。损伤组织必须及时修复，外源感染物质的侵袭需经组织内多种细胞的协同合作共同清除。

这些功能的实现皆有赖于细胞间的协同合作。这也就解释了为什么活体组织中的细胞需要持续不断地相互对话，而大部分对话由**生长因子**（GF）负责传达。这些相对分子质量较小的蛋白质经细胞分泌，胞内运行，最终作用于其他细胞，传递它们独特的生物学信息。生长因子将组织内的细胞联结成为一个有机的整体，相互间进行着持续不断的交流沟通。

细胞是否生长由整个组织及全部有机体的需要而定，并非仅出于有利于某些组分生长的目的。正因如此，活体内没有一个细胞被赋予自主权，决定该细胞是否增殖或维持静息状态。这一决议需要与组织中其他细胞共同商议后才能做出。周围细胞可以通过促使某种特殊细胞分泌生长因子以刺激靶细胞的增生，也可以通过释放生长抑制因子而抑制其增生。最终，一个体细胞做出的细胞是否增生的决定必然反映了周围细胞的群体意见。

图 5.2 组织形态的维持 这里所显示的小肠上皮细胞层阐述了一个事实，即许多不同类型的细胞在一个组织中共存，共同创建一个正常的组织形态并维持其功能。每一种细胞类型的相对数量及位置必须被严格控制。这一控制主要通过组织内相邻细胞间信号的相互交换而达到。在这一特殊上皮内，细胞间信号还确保了新生上皮细胞——在小肠内称为肠细胞不断地自肠隐窝内生发，以替代其他沿肠绒毛侧壁向顶端移行并最终在顶端脱落的细胞。这些上皮细胞中包括分泌黏液的杯状细胞（暗红）和吸收细胞，以及肠内分泌细胞和潘氏细胞（未示）。此外，每个肠绒毛的中心地带是间质细胞聚集的核心，它们共同组成了基质，主要包括成纤维细胞、内皮细胞、周边细胞和巨噬细胞。这些多样的细胞型必须维持适当比例才能确保组织的正常结构和功能。（From B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.）



以活组织中分离出正常细胞，而后在培养皿中进行培养的试验，可以充分说明个体细胞对环境的依赖性。即便细胞上层的液体介质中包含了所有细胞生长繁殖所需要的营养成分，包括氨基酸、维生素、葡萄糖及盐类，使用此种介质仍无法诱导细胞增殖。但是，一旦在这种介质中加入小牛或胎牛的血清，细胞即可增殖，这是因为血清中含有促使细胞增生的生长因子。

血液凝固时可产生血清，血小板相互黏附聚集并逐渐收缩，将血液中的细胞成分网罗其中，红细胞和白细胞均包含于其内。对于受伤组织而言，血凝块的形成有利于阻止继续出血。而血凝块形成并收缩后所剩余的清亮液体，即为血清。

当血小板在伤口处相互聚集以形成血凝块时，它们同时还通过向其周围释放生长因子，主要是血小板衍生生长因子（PDGF），启动了伤口的愈合过程（图 5.3）。PDGF 可有效刺激成纤维细胞增生，使之形成包括上皮下细胞层的大部分结缔组织（见图 2.3）。像 PDGF 这样的生长刺激因子通常被命名为**促（细胞）分裂原**，以显示其促进细胞增生的能力。更特别的是，PDGF 可将成纤维细胞吸引至伤口处，而后促进其增殖

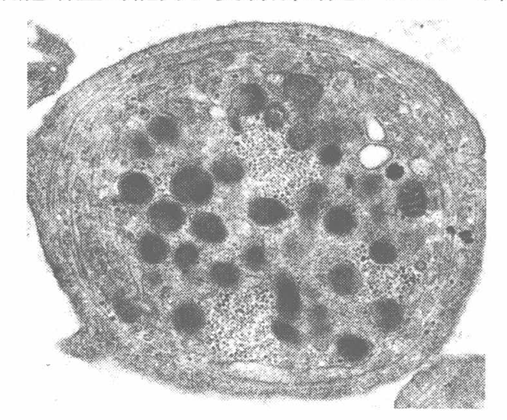


图 5.3 血小板贮存 PDGF 血小板携带大量称为颗粒的（胞外）分泌小泡（大黑点），它们含有大量重要的信号分子，其中最突出的是几种血小板衍生生长因子（PDGF）。在血栓形成过程中，当血小板被活化时，这些小泡与细胞膜融合，向细胞外间隙释放之前存储于其中的丝裂原及生长因子。（Courtesy of S. Israels.）

(图 5.4A)。其他的生长因子，如上皮生长因子，同时还可使上皮形态发生巨大改变(图 5.4B)。如果没有血清中 PDGF 的刺激，在细胞培养皿内培养的成纤维细胞虽可在几周内存活并保持正常的新陈代谢，但无法继续生长和分裂。

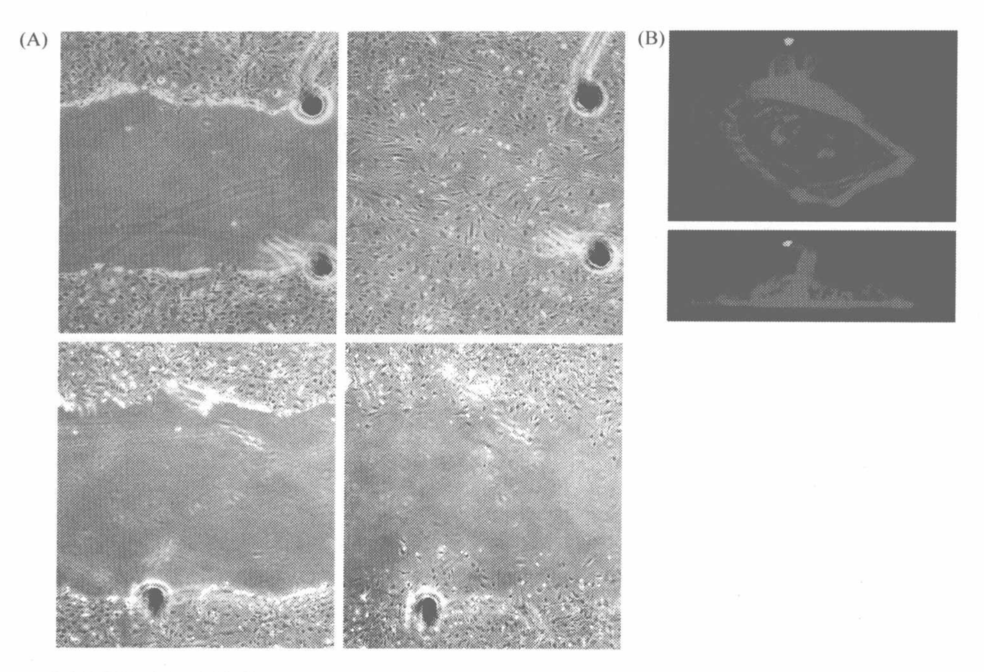


图 5.4　生长因子对细胞的作用　(A) 血栓形成时血小板释放的 PDGF 是成纤维细胞强有力的吸引剂和丝裂原，它使得成纤维细胞涌向伤口处以重建组织。在这个伤口愈合的体外模型中，两个培养皿中的单层成纤维细胞均被吸管头划损（左侧）。在它们的培养基中加入一种形式的 PDGF（PDGF-BB)，大量野生型成纤维细胞（左上）在 48h 内移行到伤口处（右上）。然而，对 PDGF 无反应（通过丢失一个细胞表面 PDGF 受体，左下）的突变型成纤维细胞则在相同时间段内无法移行至伤口处（右下)。(B) 被固定在颗粒（绿点）上的表皮生长因子（EGF）被放入小鼠乳腺癌细胞 5min 后，细胞重组其肌动蛋白细胞骨架（红色）并自胞质内向生长因子伸出触角（上图，平面观；下图，侧面观）。(A，from Z. Gao et al.，J. Biol. Chem. 280：9375-9389，2005；B，from S. J. Kempiak et al.，J. Cell Biol. 162：781-787，2003.)

成纤维细胞生长所需的生长刺激信号由第二种细胞发放（这里指血小板)，这正反映了活体内促进或抑制细胞增长的数以百计的相似的细胞通讯途径。更进一步讲，PDGF 和 EGF 分属于两大类不同的生长因子，这些生长因子控制着细胞间生长刺激信号的传递。

在本章的下述环节中我们将看到，癌基因编码蛋白质使细胞无法感知周围环境中生长因子的存在，阻止信号传入细胞内部，并妨碍这些信号的进一步处理。通过取代正常细胞的生长刺激机制，癌蛋白可诱使细胞相信周围环境中存在的正是生长所需的生长因子。一旦诱导成功，细胞便会开始增殖，其反应与大量生长因子存在于其周围介质中时所介导的反应一样。

5.2 Src 的酪氨酸激酶功能

细胞间信号如何通过生长因子传递的第一条线索来源于对癌基因 v-*src* 及其特定蛋白质产物的生化分析。在此线索的引导下，我们不断深入，依次对该蛋白质、细胞感知生长因子所用的受体和控制正常及恶变细胞增殖的胞内信号通路进行了研究。

对 v-*src* 编码癌蛋白的首次鉴定即引起了人们的广泛注意，这一最早被研究的细胞癌蛋白使肿瘤学家们首次能够从生化机制的角度来理解细胞转化。经分子克隆技术处理以后，*src* 癌基因编码蛋白质产物的氨基酸序列可直接从克隆基因的核苷酸序列推导得出。该蛋白质为由 533 个氨基酸残基组成的多肽链，其分子质量约为 60kDa。

Src 氨基酸序列的破译未能给揭示癌蛋白到底如何促使细胞增殖及转化这一问题提供多少线索。被 v-*src* 癌基因转化的禽类及哺乳动物细胞显示出许多不同的特性：细胞

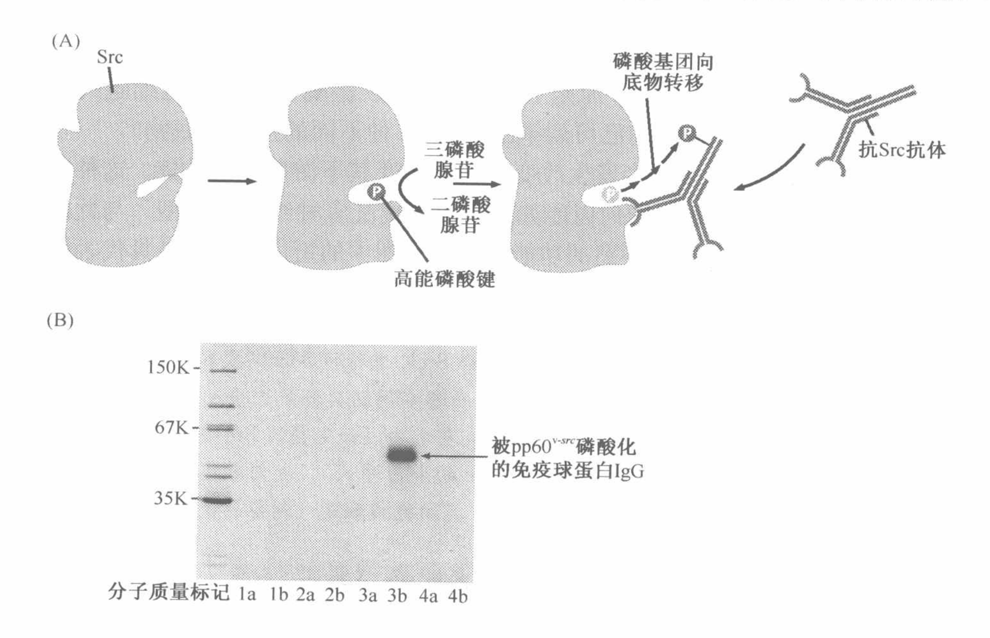


图 5.5 Src 磷酸化一个沉淀的抗体分子 蛋白激酶通过从 ATP 上移去高能 γ 磷酸键并将之与底物蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸侧链上的羟基连接而起作用。（A）用于免疫沉淀 Src 分子的抗体（见信息栏 5.1）也可作为该激酶磷酸化的底物。一个连附其上的磷酸基团（红色）显示其磷酸化。（B）该实验首次证实，生化反应与癌蛋白相关。用正常兔血清（电泳泳道 1a、2a、3a、4a）和负载 RSV-诱导肿瘤的兔血清（电泳泳道 1b、2b、3b、4b）共同免疫沉淀经^{32}P放射标记 ATP 孵育的细胞裂解物。裂解物制备见下述：未感染的鸡胚成纤维细胞（CEF）（泳道 1a、1b），被禽类白血病病毒（ALV）感染的 CEF（泳道 2a、2b），野生型（wt）RSV-感染的 CEF（泳道 3a、3b）和被-RSV 转化缺陷突变株感染的 CEF（泳道 4a、4b）。结果显示，只有与负载肿瘤兔血清和感染野生型 RSV 结合的 CEF 得到一个与沉淀抗体共迁移的由强^{32}P标记的蛋白质，说明抗体分子被 Src 癌蛋白磷酸化（在本分析中分子质量不明显）。（B，from M. S. Collett and R. L. Erikson，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75：2021-2024，1978.）

形态完全改变；与正常细胞相比可从周围介质中更快地摄取葡萄糖；以不贴壁的方式生长；失去接触抑制并且形成肿瘤。不管 Src 蛋白精确的作用机制到底是什么，其直接或间接的作用于大量的细胞靶点这一事实是显而易见的。

1977～1978 年间，睿智的生化学家们攻克了 Src 如何发挥作用这一难题。他们研制出能与 Src 特异识别并结合的抗体（信息栏 5.1），当其在同时含有 Src 及三磷酸腺苷（细胞的万能供磷酸根者）的溶液中孵育时，该抗体被磷酸化。磷酸化即指特定氨基酸残基与磷酸根基团的共价连接。由此可知，Src 是作为**蛋白激酶**发挥作用的，即将 ATP 的一个高能磷酸键转移至一个适宜的蛋白质底物，这里指抗体分子（图 5.5）。Src 在正常情况下并不磷酸化抗体，而它在早期试验中的磷酸化功能提示，其在细胞中的作用方式往往为磷酸化某些目的蛋白。

不依赖于其自身的激酶活性，Src 本身就是一个**磷酸化蛋白**，即它所携带的磷酸根基团能与其自身的一个或多个氨基酸侧链形成共价连接。同时，这也表明 Src 也可作为底物被蛋白激酶磷酸化——**自身磷酸化**或者充当其他激酶磷酸化的底物。最初，人们根据其分子质量及其磷酸化的蛋白质状态而将之命名为 $pp60^{src}$，以下我们将简称之为 Src。

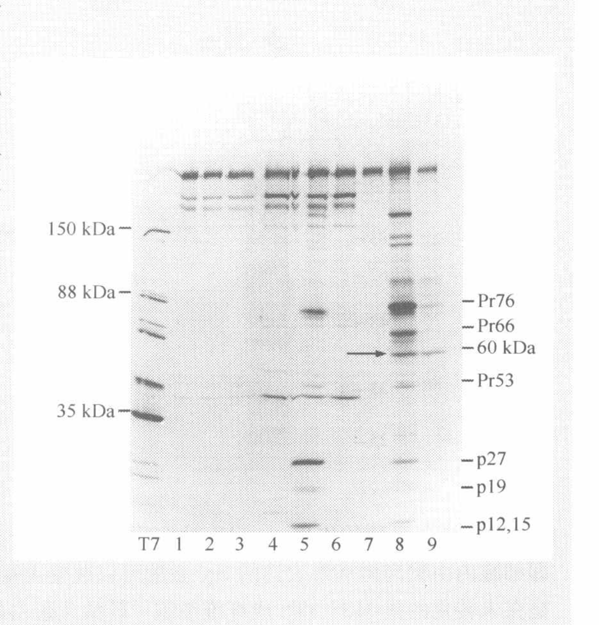
Src 激酶功能的揭示意义深远。原则上，一种蛋白质激酶可以磷酸化细胞内多种不同的蛋白质底物（以 Src 为例，目前已可列举出多于 50 种不同的蛋白质底物），一旦被磷酸化，这些底物蛋白质的功能可能会发生改变，进而改变其下游靶点的功能。这种作用机制似乎可以解释像 Src 这样的蛋白质何以能如此多效地扰乱多种细胞的表型。与此同时，其他蛋白激酶也被发现有调节复杂环路的功能，以糖代谢中的蛋白质激酶最具代表性。

信息栏 5.1　制备抗 Src 抗体时所面临的巨大挑战　对细胞内成千上万种蛋白质的详尽生化分析，依赖于以胞内繁多的蛋白中对目的蛋白（如 Src）进行特异性探测和分析的能力。这种探测往往依靠可以特异性识别并结合蛋白（如 Src），而忽略周围其他胞内蛋白的抗体。这种抗体的制备包括向动物（常使用鼠、兔、山羊）体内注入完整蛋白（如完整的 Src 蛋白）或化学合成的**寡肽**（如某小分子蛋白，其氨基酸序列反映一小段 Src 的蛋白序列）。我们希望向动物体内注入的物质具有**免疫原性**（可引起免疫反应），使之形成可从其细胞**裂解液**（制备的被破坏的细胞）中特异性结合并沉淀该蛋白的抗体。

哺乳动物的免疫系统一般对外源性抗原，即指携带有免疫系统不熟悉或全新多肽序列的蛋白质反应强烈。与之相反，免疫系统往往不能对注射入动物体内的，与正常存在的蛋白质极相似的**抗原**进行免疫应答。这种针对相似蛋白的免疫活性的缺失称为**免疫耐受**，我们将在第 15 章中对这一现象进行阐述。

最先制备抗 Src 抗体的研究小组使用的是可以感染并转化哺乳动物细胞并诱导哺乳动物肿瘤的 RSV 病毒株。他们希望得到的肿瘤可以表达鸡 Src 蛋白，死亡的肿瘤细胞即可将该蛋白呈递给荷瘤宿主的免疫系统，由此促发免疫反应。事实证明，Src 蛋白在大多数动物中很少存在免疫源性，其谜底在很久之后才被解开，Src 蛋白的结构在进化中高度保守。因此，鸡 Src 蛋白在大多数哺乳动物种群中与其相应蛋白结构几乎相同，从而无法被当作外源蛋白而由免疫系统所识别。最终，这些研究者们仅在应用免荷-RSV 诱导肿瘤制备抗 Src 抗体时获得了成功（原因不明）。决定蛋白质（如不同种属的 Src）免疫原性的因素往往复杂并且晦涩不清。一旦得到，抗 Src 的抗血清可用于从多种 RSV 转化细胞和正常的未转化细胞（图 5.6）的裂解液中沉淀（如免疫沉淀）Src 蛋白。人们长期找寻的 Src 蛋白最终被测得为在图 5.6 的第 8 第 9 泳道中移行的、分子质量为 60kDa 的蛋白质。

图 5.6　免疫沉淀 Src 蛋白　当 Src 蛋白首次被分析时，研究它的唯一方法是靠从胞内混合存在的成百上千种蛋白质中将之免疫沉淀出来。在本例中，许多制造抗 Src 血清的尝试最终获得了可用于从细胞中免疫沉淀该蛋白质的抗体。分子质量标记物（以道尔顿为单位）在最左边的 T7 泳道中；1～3 泳道：正常，未感染细胞的裂解物；4～6 泳道：被缺乏 *src* 基因的 RSV 突变株感染的细胞裂解物；7～9 泳道：被野生型 RSV 感染的细胞裂解物；7 泳道：正常兔血清；8 泳道：荷瘤兔血清；9 泳道：除与 RSV 颗粒裂解物孵育外其他与 8 泳道相同。在 8 和 9 泳道中的 60kDa 的条带（箭头所示）代表的是首次探测到的 RSV 癌蛋白（p12、p15、p19、p27、Pr53、Pr66 和 Pr76 是 RSV 的病毒蛋白）。（From A. F. Purchio et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75：1567-1571，1978.）



不久之后，人们又发现 Src 与在此之前发现的其他蛋白质激酶显著不同。已知其他的蛋白质激酶是将磷酸基团连接到丝氨酸和苏氨酸氨基酸残基的侧链上。然而，Src 则磷酸化蛋白质底物的某些酪氨酸残基。对细胞内被磷酸化的氨基酸残基进行仔细的定量分析更可显示该酶活性的与众不同。在正常细胞内多于 99%的磷酸氨基酸为磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸，磷酸酪氨酸仅占这些细胞内全部磷酸氨基酸的 0.05%到 0.1%。

经 v-*src* 癌基因转化细胞后，我们发现，胞内磷酸酪氨酸水平显著升高，占这些细胞磷酸氨基酸总量的 1%（这有助于解释图 5.7A 中两条带间的显著差异）。当用其他癌基因，如 H-*ras*，转化相同的细胞时，我们发现这些细胞的磷酸氨基酸组分并没有什么改变。因此，磷酸酪氨酸残基的产生是 Src 的特有产物，并且与细胞转化的机制无关。在随后的研究中人们得出了第二条与之相关的结论：在哺乳动物细胞中，通过酪氨酸磷酸化传递信号的这种机制主要出现在丝裂原信号转导通路中，而其他信号转导途径中所涉及的成千上万的激酶，则基本上仅依靠丝氨酸及苏氨酸磷酸化来传递信息。

丧失磷酸化底物蛋白质能力的 Src 突变型也同时丧失了它的转化功能。故而不断累积的证据皆指向一点：Src 通过其酪氨酸激酶活性以及磷酸化这些细胞中的一组仍未定性的蛋白质而成功地转化细胞。作为重要的起始线索，这些进展再次促使围绕该研究领域的另一重要问题的形成，该问题可被陈述如下：酪氨酸残基的磷酸化如何导致细胞转化？

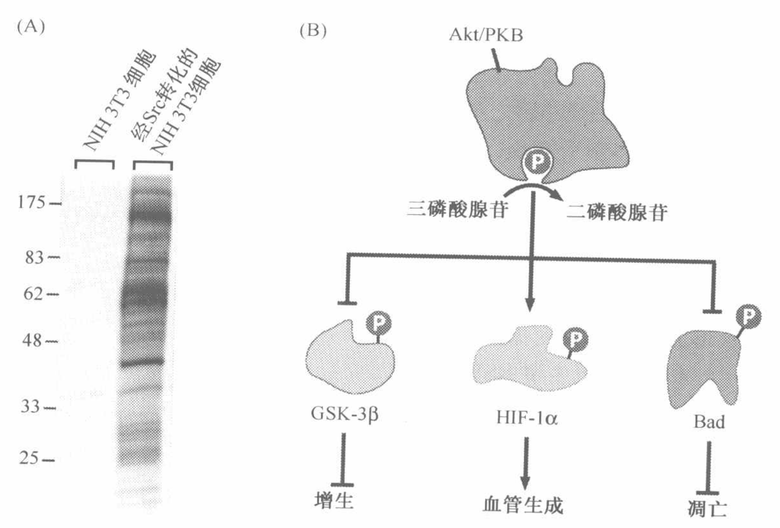


图 5.7 蛋白激酶的作用 (A)这张用凝胶电泳分离的蛋白质放射自显影图描述了这样一个事实，即细胞内由猴肉瘤病毒表达的 Src 激酶可以改变大量不同蛋白质族的磷酸化状态。左侧泳道显示的是在未转化的鼠 NIH 3T3 成纤维细胞中磷酸化蛋白的排列；右侧泳道显示的是表达活化 Src 激酶细胞的磷酸化蛋白。以 kDa 为单位的分子质量标记物显示在图的左侧。事实上，该分析特异地检测了携带有磷酸化酪氨酸残基的蛋白族，Src 激酶的产物（见图 5.8）。本图的左侧泳道一片空白，指出在没有 Src 表达的细胞中相对缺乏含有磷酸化酪氨酸的蛋白质。(B)一种蛋白激酶的多效性往往来源于其具有磷酸化并因此改变大量不同底物蛋白功能状态的能力。这里列举的是 Akt/PKB 激酶的作用，它是一种丝/苏氨酸蛋白激酶，可以通过对主要控制蛋白的磷酸化影响广泛的生物过程。因此，Akt/PKB 可以使 GSK-3β 的抗增生作用和 Bad 的促凋亡能力失效，并活化 HIF-1α 的血管发生（诱导血管生成）功能。(A，from S. M. Ulrich et al.，Biochemistry 42：7915-7921，2003.)

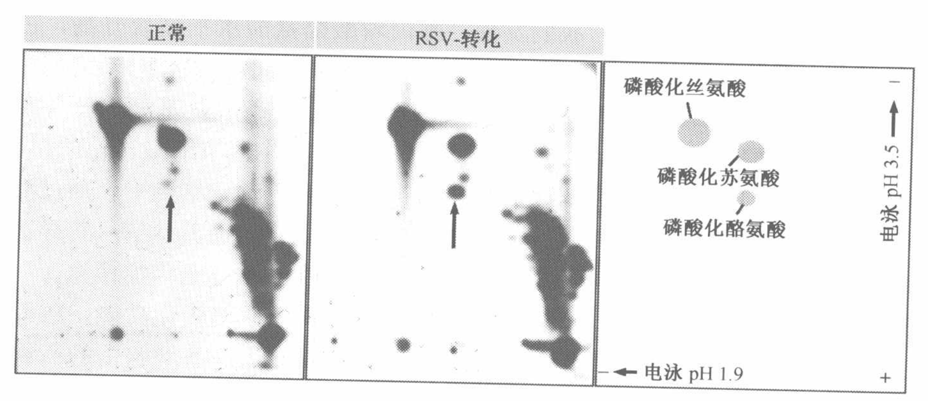


图 5.8 Src 激酶的底物特异性 我们可以用电泳法分离三种不同的磷酸化氨基酸——磷酸酪氨酸、磷酸苏氨酸和磷酸丝氨酸。在本图中，电泳阴极的 pH 自右向左设置为 1.9，自底向顶设置为 3.5。右图显示的是三种磷酸化氨基酸经电泳后的预计位置。在正常鸡胚成纤维细胞中（CEF，左图），呈现出大量的磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸，而磷酸化酪氨酸则基本缺无（箭头所示）。然而，在 src-转化的 CEF 中（中图），磷酸化酪氨酸的水平则显著上升。无关的磷酸化复合物及无机磷显示在电泳图的右下侧。(Courtesy of T. Hunter.)

5.3 EGF受体的酪氨酸激酶功能

在对 v-*src* 癌基因克隆并测序之后，其他许多急性逆转化病毒的癌基因也通过分子克隆得以分离并进行了DNA测序。遗憾的是，在绝大多数案例中，这些蛋白质产物的氨基酸序列未能给对其生化功能的研究提供多少线索。而接下来的又一重大发现则是由其他研究领域得出的。对细胞间如何进行信号交换感兴趣的细胞生物学家们分离出许多参与胞间信号传递的蛋白质，并测定了这些蛋白质的氨基酸序列，令人意想不到的是，这些信号蛋白与某些癌基因的蛋白质产物紧密相关。

这一研究始于上皮生长因子（EGF），它是第一个被发现的生长因子。EGF最初特征的定位源于其可刺激新生小鼠不成熟眼的睁开。不久之后，人们发现，EGF对多种上皮细胞有丝裂原效应。

对由EGF刺激生长的细胞，EGF可结合于这些细胞表面，而其他无法与EGF结合的细胞对其丝裂原作用并无反应。综合而言，这些观察结果提示一种细胞表面蛋白的存在——EGF受体（EGF-R），它可特异性识别胞外的EGF，并与之结合，将信息向胞内传递。从生化角度来说，EGF是其同源受体——EGF-R（这个受体仍处于假说阶段）的配体。

分离EGF-R蛋白极具挑战性，因为该受体和其他很多受体一样在细胞内的表达水平非常低。研究者通过使用一种人类肿瘤细胞（子宫上皮癌细胞）巧妙地解决了这个问题，该细胞可表达高水平的EGF-R——比正常水平高100倍。这些细胞可产出大量受体蛋白质，之后通过生化的方法分离纯化并进行氨基酸序列分析。

EGF-R氨基酸序列的得出，为我们了解该蛋白的整体结构特征以及这一结构如何产生功能开启了一个重要的窗口。其较大的N端结构域有621个氨基酸残基，突入细胞外空间（故命名为其**胞外结构域**），主要负责识别并结合EGF配体。EGF受体所具有的第二个特征结构域为许多细胞表面糖蛋白所共有，这个**跨膜区**由23个氨基酸残基组成，由胞外穿过细胞膜的脂质双层伸入细胞质，这段跨膜区域的存在可以由位于该蛋白质序列正中间的连续延伸的一段**疏水**氨基酸残基推导得出；EGF-R蛋白的这段结构域在构成细胞膜的脂质双层这一高度疏水的环境中稳定存在。最后，C端（即最后合成的链的末端）由542个氨基酸残基组成EGF受体的第三个结构域，伸展进入细胞质（图5.9）。

从EGF受体的整体结构可以大致推断出它是如何发挥作用的，其胞外结构域与EGF结合之后，一个信号被传导通过细胞膜以激活受体的胞内结构域，胞内结构域一旦被激活，将释放促使细胞生长分裂的信号。有重要意义的是，对该胞内结构域的检测显示，它与已知的Src蛋白质序列有明确的序列相似性（图5.9A）。

顷刻间，EGF受体如何在胞内释放信号变得清晰起来：一旦其胞外结构域结合EGF，其胞内结构域的Src样激酶将以某种方式被激活，之后磷酸化某些胞内蛋白质的酪氨酸，从而使细胞增生。随后的测序实验结果显示，许多酪氨酸激酶都有整体的结构相似性，其中许多可产生癌蛋白样作用（图5.9B）。

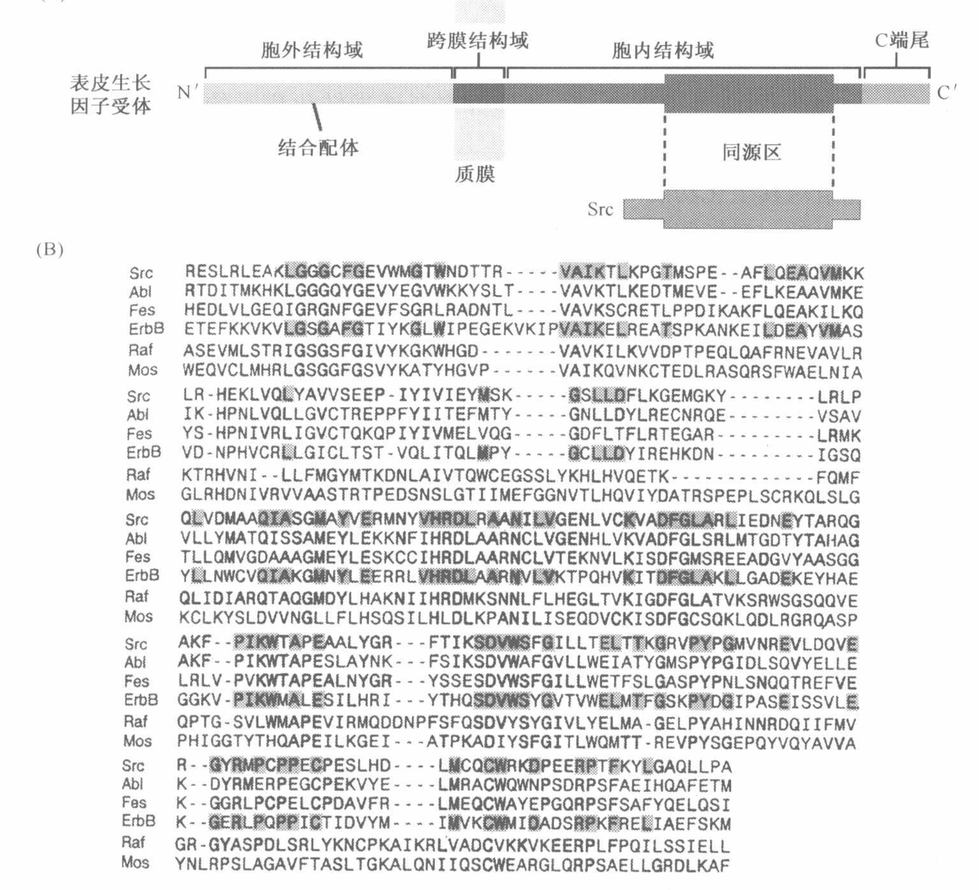


图 5.9　EGF 受体结构　(A) 生长因子受体 (EGF-R) 是一个由胞外结构域 (绿色)，穿过细胞膜的跨膜结构域 (棕色)，与胞内结构域 (红色，蓝色) 组成的复杂蛋白质。(B) 将 EGF-R 胞质结构域的氨基酸序列与和 Src 序列相同的区域 (绿色) 进行对照 (使用单字母氨基酸密码子)，结果显示，EGF-R (这里标记为 ErbB) 同 Src 相似，通过酪氨酸激酶方式发放信号。而其他病毒癌蛋白，如 Abl 和 Fes，也被发现与这两者有相似的氨基酸序列，但其序列相似度似乎更为分散 (举例来说，在 Src 和 ErbB 之间)。尽管如此，这些数量相对较少的共有残基依然显示了这些蛋白质间清晰的进化相关性 (同源性)。这里同时还展示了另外两种癌蛋白——*raf* 和 *mos* 的癌基因产物，其关联性更远 (丝/苏氨酸激酶)，并且与 Src 和 EGF-R 的共有序列更少。(Adapted from G. M. Cooper, Oncogenes, 2nd ed. Boston and London: Jones and Bartlett, 1995.)

自从这些对 EGF 受体结构的分析开展以来，大量结构相似的其他受体也纷纷被描述 (图 5.10)。正如后文将讨论到的那样，任一受体都有其独立的一个或一系列生长因子配体 (表 5.1)。借助于这些独特的生长因子-受体组合，可激发胞内除刺激细胞生长分裂外的多重生物学效应。这些效应中较为重要的是细胞形态、细胞存在及**细胞动力**的改变。有趣的是，这些受体及其配体的发现代表了某些新近在进化方面的发现 (信息栏 5.2)。

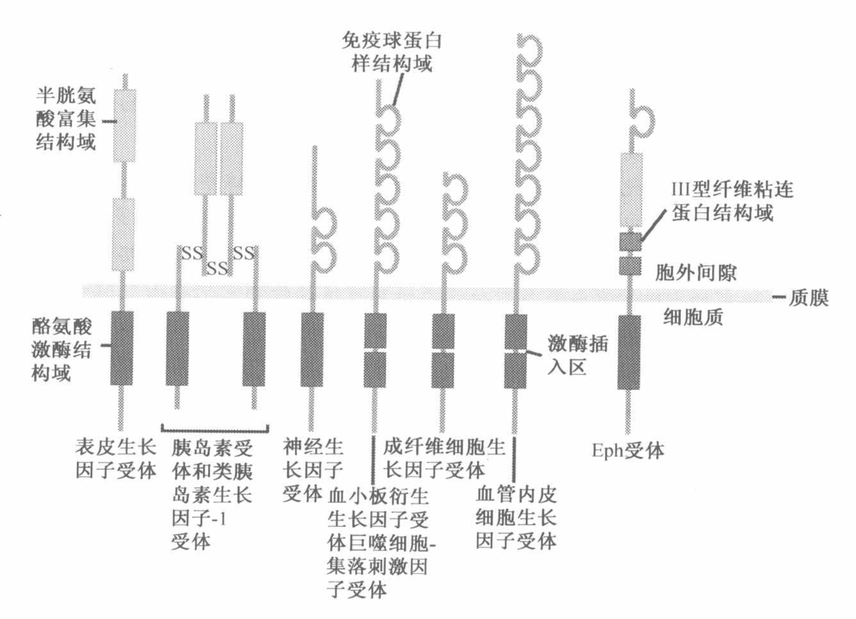


图 5.10 酪氨酸激酶受体的结构 EGF 受体（图 5.9）仅仅是由人类基因组编码的一大组结构相似的受体中的一员。这些酪氨酸激酶受体可以根据其结构的特点被列入不同的家族中。这些家族中最具代表性的受体已被列于此。它们都具有非常相似的胞内酪氨酸激酶结构域（红色），虽然在许多例子中（如 PDGF 受体），该激酶的中间区域被小的“插入”区域打断。这些受体的胞外结构域（伸入胞外空间，绿色或灰色）结构高度变异，反映它们可以识别并结合大量胞外配体（From B. Alberts et al.，Molecular Biology of the cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.）

表 5.1 在肿瘤发生中常常涉及的生长因子（GF）及酪氨酸激酶受体

GF 名称	受体名称	受生长因子调控的细胞
PDGF[a]	PDGF-R	内皮细胞，血管平滑肌细胞，成纤维细胞，其他间质细胞，神经胶质细胞
EGF[b]	EGF-R[c]	多种上皮细胞，某些间质细胞
NGF	Trk	神经元细胞
FGF[d]	FGF-R[e]	内皮细胞，成纤维细胞，其他间质细胞，血管平滑肌细胞、神经外胚层细胞
HGF/SF	Met	多种上皮细胞
VEGF[f]	VEGF-R[g]	毛细血管及淋巴管内皮细胞
IGF[h]	IGF-R1	多种细胞类型
GDNF	Ret	神经外胚层细胞
SCF	Kit	造血细胞，间质细胞

a PDGF 代表四种不同的多肽链，PDGF-A，-B，-C 和-D。这些 PDGF 受体至少由两种不同的亚基组成，α 和 β，它们可以同源二聚化或异源二聚化并以不同的方式连接配体。

b EGF 家族的配体，都与 EGF-R（ErbB1）和（或）erbB1 的异源二聚体和与其相关的一个受体（脚标 C）结合，包括（除 EGF 外）TGF-α、HB-EGF、双调蛋白、betacellulin 和 epiregulin。

c EGF-R 受体家族由四种不同的蛋白质组成，包括 ErbB1（EGF-R）、ErbB2（HER2，Neu）、ErbB3（HER3）和 ErbB4（HER4），它们通常以异源二聚体受体形式与配体结合。例如，ErbB1＋ErbB3，ErbB1＋ErbB2 或 ErbB2＋ErbB4、ErbB3 没有激酶活性，当它与 ErbB2 共同形成异源二聚体时被 ErbB2 磷酸化。ErbB3 和 ErbB4 与 neuregulin 结合，neuregulin 通过交替剪接产生，是一组多于 15 个成员的配体家族。ErbB2 本身没有配体，但有很强的酪氨酸激酶活性。

d 许多 FGF 组成了 GF 大家族。它们的原型为酸性 FGF 和碱性 FGF。除此之外该家族中还包含其他已知的成员。

e 目前已有四种被很好标记的 FGF 受体。

f 目前已有四种已知的 VEGF：VEGF-A 和-B 参与血管发生，而 VEGF-C 和-D 主要参与淋巴管形成。

g 目前已有三种已知的 VEGF-R：VEGF-R1（也称作 Flt-1）和 VEGF-R2（也称作 Flk-1/KDR），参与血管发生；VEGF-R3 参与淋巴管发生。

h 两种已知的 IGF，IGF-1 和 IGF-2，均与胰岛素的结构相关，刺激细胞的生长（如细胞体积的增大）和生存，它们同时还具有丝裂原性。

缩写：VSMC，血管平滑肌细胞。

部分改编自 B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.

信息栏 5.2　细胞的新老元件　细胞间通信机制的产生在地球上生命体进化的历史中相对较新。最早的有生命的细胞大约起源于距今约 35 亿年前，在此后的 28 亿年左右，地球上的生命体完全是单细胞生物，先为原核细胞，后为真核细胞。仅在最后的 6 亿～7 亿年间，细胞学会了相互沟通，这些沟通方式使它们形成了复杂的组织并创建了原虫机体蓝图。

细胞间通信这一相对较晚进化形成的胞间生命活动与细胞内及在这些细胞表面上的蛋白质存在联系。绝大多数在原虫体内发现的胞内蛋白质意义深远。这些蛋白质进行的许多活动，比如能量代谢、大分子物质的合成和细胞的生长及分化早在 15 亿年前就对单个真核细胞起着至关重要的作用。基于这个原因，许多对我们细胞内蛋白质功能的研究可通过检测它们在面包酵母或裂殖酵母细胞内同源蛋白质的功能而得以有力地展开。

存在于细胞表面的蛋白质和细胞间进行交换的蛋白质相比较之下都是些新成员。他们祖先中的绝大多数都无法在由单个真核细胞合成的蛋白质中找到。许多新蛋白质是在原虫生命体中首次出现，或在大多数或全部现代原虫以稳定的可识别态繁衍时出现的。这就解释了我们为什么可以通过得力的基因技术进一步加深我们对生长因子以及它们如何进行信号传递这些问题的理解，因为这些技术可以让研究者们剖析简单的原虫生物（如蠕虫和果蝇）的胞内通信系统。

5.4　转变的生长因子受体可发挥癌蛋白样作用

1984 年，人们证实 EGF 受体序列与已知的由 *erbB* 癌基因特异性编码的癌蛋白序列高度相关，这一发现极具震撼力。该癌基因最初是在禽成红细胞增生病毒（AEV）的基因组中被发现的，AEV 是一种可迅速诱导前体红细胞白血病（即**红白血病**）的逆转化病毒。由此，细胞生物学的两个不同领域被联系起来。一个被细胞用于感知周围环境中生长因子的蛋白质被挪用（以禽类的形式），并被转换成为一种高效的由反转录基因编码的癌蛋白。

在一次详细的检测中，人们发现由禽成红细胞增生病毒的 *erbB* 癌基因编码的癌蛋白缺少 EGF 受体 N 端胞外结构域的序列（图 5.11）。在没有 N 端序列的情况下，ErbB 癌蛋白无法辨认及结合 EGF，因此，它的作用是高效地刺激细胞增殖。这一发现导出了一个有趣的推论并在随后被证实：胞外结构域的缺失可通过某种方式使被截短的

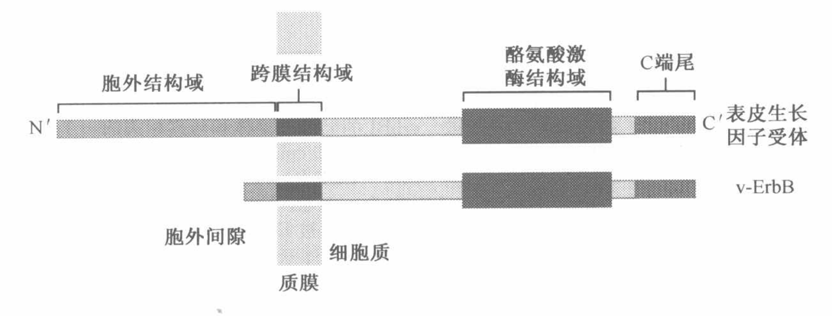


图 5.11　EGF 受体和 v-ErbB　EGF 受体和禽成红细胞增生病毒的 v-ErbB 癌蛋白相互联系紧密。更特殊的是，v-ErbB 蛋白可以被改变构型的编码鸡 EGF 受体的基因所特化，该基因编码了一个缺少正常胞外结构域（绿色）的截断型 EGF-R。这样的一个截断型受体可以不断地发放丝裂原信号，即不需要通过 EGF 配体的刺激。

EGF 受体蛋白向细胞内源源不断地发放生长刺激信号，完全不依赖于 EGF。如图 5.12A 所示，编码生长因子受体的基因突变，包括那些特异性截短的受体，可以激发不依赖配体的受体活化。的确，包括使某些受体的跨膜区（已示）或胞外和胞内结构域（未示）发生氨基酸替代在内的一系列突变，可以激发非配体依赖性的受体活化。在第 16 章中，我们将看到这些结构改变的受体将如何影响人类肿瘤对抗癌治疗药物的反应。

这些对受体功能的领悟为长期以来一直存在于肿瘤细胞生物学中的问题提供了答案。正如前面所提到的，正常细胞通过从其培养基中获得生长因子而生长早已是众所周知，然而，癌细胞在生长和生存过程中，对生长因子的依赖性则大大降低。对 ErbB-EGF-R 间联系的发现为癌细胞这一特性提供了一个简单明了的解释：ErbB 癌蛋白所释放的信号与那些经配体激活的 EGF 受体所释放的信号非常相似。然而，不同于 EGF 受体的是，ErbB 癌蛋白可以持续不断地向细胞内发放生长刺激信号，从而说服细胞认为周围存在着大量的 EGF，其实那里可能什么也没有。

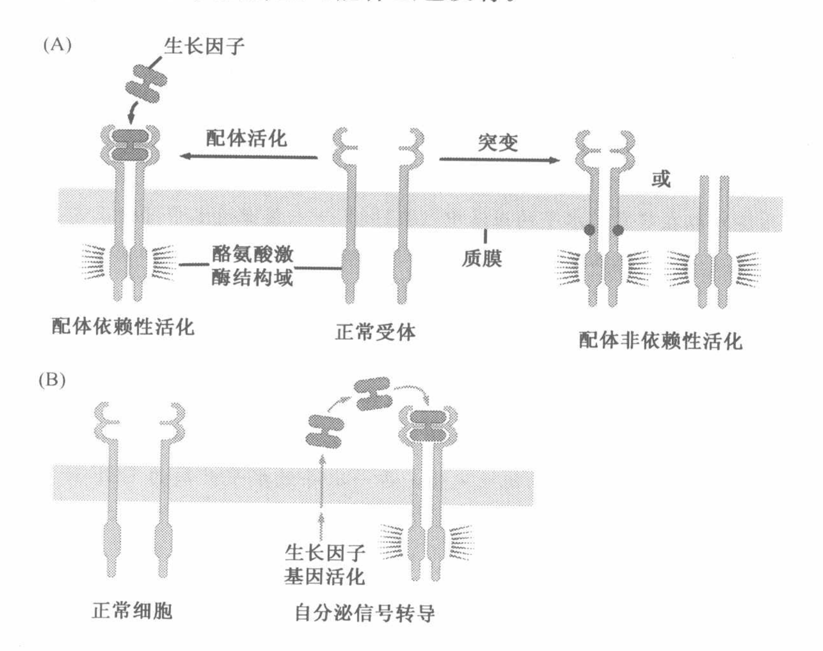


图 5.12 反常的受体激活 （A）正常功能态的生长因子受体在与配体（左侧，蓝色）结合的反应中向胞内释放信号（红色）。然而，编码受体分子的基因突变可以引起蛋白质结构的细微变化，比如氨基酸替代，可引起非配体依赖性的受体激活。更显著的受体结构变化包括截短胞外结构域（如图 5.11），同样也可得到一些紊乱的信号。（B）一般来说，细胞不会合成并释放与之所表达受体同源的生长因子配体。但是，在许多类型的癌症中，肿瘤细胞获得了表达在正常情况下其细胞系不表达的生长因子（蓝色）的能力，它们的同源受体可能已经被表达于这些细胞上。这就形成了一个自我刺激或自分泌信号环路。

正如在第 4.6 部分中所提及的那样，我们已经认识到，EGF 受体的截短序列已在一

系列人类肿瘤细胞型中被发现。例如，在许多肺癌中，EGF-R 的 mRNA 缺少由外显子 2 到 7 所携带的编码序列，这一缺失，将会移除受体胞外结构域的一部分特异性序列，往往导致其前体 mRNA 的选择性剪接。更具广泛意义的是，人们发现在人类肿瘤中，与 EGF 受体构造相似的生长因子受体被过表达（信息栏 5.3）或者以改变的构型被合成（表 5.2）。

信息栏 5.3　受体过表达源于一系列分子机制　细胞表面生长因子受体的过表达是通过大量不同的分子机制而得以实现的。在某些癌细胞中，受体过表达是由于编码基因的高速转录，相应地造成 mRNA 和蛋白质水平的升高。在许多类型的人类癌症中，这些受体基因常常被扩增，再一次导致 mRNA 及受体蛋白的相应增加。

此外，其他的，更为精细的机制也可能造成细胞表面受体分子数的增加。其中之一源自掌管受体寿命的机制。许多受体仅在有限的时间内出现在细胞膜表面，随后即通过胞吞作用而被内化。胞吞，即一小块细胞膜连同相关蛋白质被一同拉入细胞质，形成小泡，随后，这些小泡中的内容物被送入**溶酶体**中，在那里它们被降解，也可能再循环重新回到细胞表面。

有一种叫做亨廷顿作用蛋白（HIP-1）的蛋白质，是参与并协助内吞的蛋白质复合体的一个组成元素。HIP-1 被发现在许多人类癌症中过表达。由于某些尚未阐明的原因，HIP-1 的过表达阻止了许多细胞表面蛋白的正常内化，也包括 EGF-R。其结果是，过表达 HIP-1 的细胞在细胞表面累积了过量的 EGF-R，同时在 NIH 3T3 的鼠成纤维细胞中 EGF-R 变得对 EGF 高度敏感，这就解释了为什么这些细胞可以在非常低水平的血清中（0.1%）——该血清水平可使正常 NIH 3T3 细胞退回不生长的静止态——活跃地生长。更有甚者，这些细胞可以在含 10%血清的组织培养基中变为转化态——常规用于繁衍未转化 NIH 3T3 细胞的血清浓度。

另一种叫做细胞周期蛋白 G 相关激酶（GAK）的蛋白质，可有效促进 EGF-R 的内化。当它的表达受抑制时，细胞表面的 EGF-R 水平可增长 50 倍之多。其在人类肿瘤中的表达水平尚未被量化。还有一种蛋白质，叫做 c-Cbl，通过叫做单泛酰化的共价修饰标记配体激活 EGF-R（在信息栏 7.8 中介绍）。这一标记引起了 EGF-R 的内化及其随后在溶酶体中的降解。v-Cbl 病毒癌蛋白以及几种胞内蛋白质（Sts-1、Sts-2）可以阻止内化，再一次导致水平升高的 EGF-R 在细胞表面的累积。更具普遍意义的是，由于受体过表达造成的生长因子高反应性似乎促进人体内许多类型肿瘤细胞的增生。

表 5.2　酪氨酸激酶 GF 受体在人类肿瘤中的变化[a]

受体名称	主要配体	变化类型	肿瘤类型
EGF-R/ErbB1	EGF，TGF-α	高表达	非小细胞肺癌；乳腺，头和颈，胃，直肠，上皮，前列腺，膀胱，肾，胰腺，卵巢癌，神经胶质瘤
EGF-R/ErbB1		胞外结构域断裂	神经胶质瘤、肺癌及乳腺癌
ErbB2/HER2/Neu	NRG，EGF	过表达	30%的乳腺癌
ErbB3，4	various	过表达	口腔鳞状细胞癌
Flt-3	FL	串联复制	急性骨髓白血病
Kit	SCF	氨基酸取代（替换）	胃肠胶质瘤
Ret		与其他蛋白质融合，点突变	甲状腺乳头状癌，多发性内分泌腺瘤综合征 2A 及 2B 型
FGF-R3	FGF	过表达；氨基酸取代（替换）	多发性骨髓瘤，膀胱和子宫颈癌

a 见图 5.17。

5.5 生长因子基因可转变为癌基因：以 *sis* 为例

随着血小板衍生生长因子（PDGF）的发现以及其氨基酸序列的获知，癌蛋白可激活丝裂原信号通路这一理念又得到了一个长足地飞跃。1983 年时，人们发现 PDGF 的 B 链序列与由猴肉瘤病毒 v-*sis* 癌基因编码的癌蛋白高度相关。再一次，我们对快速转化反转录病毒的研究收获颇丰。

人们发现 PDGF 蛋白的结构与 EGF 无关，并刺激与之不同的细胞系的增生。PDGF 主要刺激间充质细胞，诸如成纤维细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞以及内皮细胞的生长，而 EGF 的丝裂原活性则主要（并非全部）作用于上皮细胞。当 PDGF 受体被分离时，该受体的特异性作用始为人知：人们发现 PDGF-R 被表达于间充质细胞的表面，而在上皮细胞上则没有表达，而 EGF-R 则主要表现为一种与之相反的表达模式（与 EGF 受体相同的是，PDGF-R 的胞内结构域利用酪氨酸激酶向细胞内播散信号。见图 5.10）。

PDGF 与 *sis*-编码癌蛋白间的联系向我们提示了另一个癌蛋白转化细胞的重要机制：猴肉瘤病毒感染细胞，随后它的 *sis* 癌基因促使被感染细胞向其周围介质中释放大量 PDGF 样 Sis 蛋白。PDGF 样分子一旦出现在细胞外，便与刚刚合成并释放它们的相同细胞上的 PDGF-R 结合。其结果是这些细胞上 PDGF 受体的有力活化，随之而来的，便是大量具有持续性生长刺激信号的细胞的出现，该生长刺激信号由配体激活的 PDGF-R 释放。

这些发现同时还解开了一个长期存在的谜团。大部分急性转化型反转录病毒可以转化一系列的感染细胞型，但据我们所知，猴肉瘤病毒只能转化成纤维细胞，却无法转化上皮细胞。PDGF-R 呈现的细胞型特异性向我们解释了由猴肉瘤病毒所致的不同的转化易感性。

有丝分裂信号体系中的蛋白质又一次与病毒癌蛋白紧密地结合在了一起。在本例中，病毒感染细胞被迫合成并释放刺激自身产生应答的生长因子，而并非由一种细胞型向其附近的另一种细胞型发送生长因子信号（通常称为**旁分泌**信号），或由机体中的一种组织经由循环系统向另一远隔组织发放信号（**内分泌**信号），它代表的是一种自我刺激，或**自分泌**信号系统，该系统中的细胞可生产自己的有丝分裂原（图 5.12B，C）。（该自分泌信号机制还可解释血友病病毒，即另一种鼠的反转录病毒，是如何诱发疾病的；见信息栏 5.4。）

信息栏 5.4　自分泌信号机制解开了血友病病毒白细胞形成的谜团　曾经，弗里德小鼠白血病病毒的生物学作用被视为一个巨大的谜团。这种病毒可以迅速导致小鼠的红白血病，但对病毒基因组的仔细分析却显示，其内没有任何从细胞基因组中获得的显性癌基因，这和所有其他快速癌基因反转录病毒相同。因此，FLV 中似乎只包含了所有反转录病毒复制时所需要的 *gag*、*pol* 和 *env* 基因（见图 3.19）。

线索来源于与 FLV 共生长的稍小的反转录病毒基因组。这个稍小的基因组，显然来源于缺失许多基因的野生型反转录基因组，它仅仅携带了编码病毒糖蛋白的基因，即与 *env* 反转录病毒基因相似并由其演化得到的基因。*env* 编码糖蛋白被反转录病毒颗粒用于黏附目的细胞，并将病毒体壳

膜与这些细胞的胞膜融合。该糖蛋白被称为 gp55，对其详细定性的研究解决了 FLV 橙红细胞白血病这一难题。人们发现 gp55 起模仿生长因子**促红细胞生成素**（EPO）的作用。一般情况下，当血氧张力低于正常时，EPO 被从肾脏释放出来，并与骨髓晚幼红细胞（成熟红细胞前体）上的 EPO 受体结合。EPO 受体的激活导致这些细胞数量增多并刺激它们分化形成**成熟红细胞**。在感染 FLV 的小鼠中，gp55 从被感染的有核红细胞中被释放出来，并以自分泌的方式结合并刺激其自身的 EPO 受体，因此造成了细胞的增生（由此得到的成红细胞前体细胞大量累积，并遭受突变形成肿瘤细胞）。对于血友病病毒如何将反转录病毒糖蛋白成功改装为有效的 EPO 形似物这一问题尚不清楚。

事实上，我们已知许多肿瘤细胞可以产生并释放大量它们自身亦可应答的生长因子（表 5.3）。一些人类癌症，如某些肺癌，可产生三种不同的生长因子（肿瘤生长因子-α 或 TGF-α、干细胞因子和 SCF，及胰岛素样生长因子或 IGF）并同时表达这三种配体的受体，从而同时确立了三条自分泌信号环路。这些信号环路对肿瘤生长具有重要作用。例如，在一次对小细胞肺癌（SCLC）患者的研究中，那些癌细胞表达 Kit，即干细胞生长因子受体（SCF）的患者，确诊后的平均存活时间仅为 71 天，而那些癌细胞不表达 Kit 的患者，则可平均生存 288 天。

表 5.3 举例说明人类肿瘤产生自分泌生长因子

配体	受体	肿瘤类型
HGF	Met	子宫内膜异位瘤、侵袭性乳腺和肺癌、骨内瘤
IGF-2	IGF-1R	结直肠
IL-6	IL-6R	骨髓瘤、头颈细胞鳞癌
IL-8	IL-8R A	膀胱癌
NRG	ErbB2[a]/ErbB3	卵巢癌
PDGF-BB	PDGF-Rα/β	骨肉瘤、神经胶质瘤
PDGF-C	PDGF-α/β	尤因氏肉瘤
PRL	PRL-R	乳腺癌
SCF	Kit	尤因氏肉瘤、小细胞肺癌
VEGF-A	VEGF-R（Flt-1）	成神经细胞瘤、前列腺癌、卡波西氏（Kaposi's）肉瘤
TGF-α	EGF-R	细胞鳞癌，乳腺及前列腺癌、胰腺癌、间质瘤
GRP	GRP-R	小细胞肺癌

a 同时也称为 HER2 或 Neu 受体。

自分泌肿瘤的冠军应该是卡波西氏肉瘤，一种与形成淋巴管的内皮细胞密切相关的肿瘤（见信息栏 3.10）。迄今为止，卡波西氏肉瘤所产生的 PDGF、TGF-β、IGF-1、Ang-2、CC18/14、CXCL11 和内皮素（所有原始细胞的配体），以及这些配体的受体已被记录在案。同时，该疾病的致病因素，存在于卡波西氏肿瘤细胞中的人类疱疹病毒-8（HHV-8）基因组，产生另外两种配体——vIL6 和 vMIP，它们的同源受体同样由发生肿瘤的内皮细胞前体进行表达。

在这些案例的大部分中，编码不同丝裂原生长因子的细胞基因由于某种原因出现表达紊乱，导致细胞内丝裂原的数量不能正常表现胞内多种蛋白质的水平，这一现象被 HHV-8 所代偿，它促使感染细胞合成两种新的、不由细胞基因组编码的生长因子。

更具普遍意义的是，自分泌信号环路似乎意味着组织和器官存在着潜在性危险。在正常组织中，个体细胞的增生几乎都依赖于从其他细胞获取的信号；这种相互依赖性确

保了细胞种群以及组织结构的稳定性。一个获得控制自身增生能力的细胞（通过产生自己的丝裂原）招致危险的逼近，因为自我强化，正反馈环路往往导致人体的不平衡。

这些由自分泌信号环路激活所产生的结果与受体蛋白结构改变时非常相似，如 ErbB/EGF-R 的表达。在这二者中，细胞都产生自己的丝裂原信号，并对外源性丝裂原的依赖性大大降低。有趣的是，这些动态变化对于抗癌药物的发展有着重要意义（信息栏 5.5）。

信息栏 5.5　自分泌信号机制影响抗肿瘤治疗的发展　对某抗肿瘤新药疗效的测试往往从分析药物影响（体外）培养细胞生长和（或）生存的能力开始，之后将这些肿瘤细胞植入宿主鼠体内，以形成肿瘤（体内）。这些荷瘤小鼠的肿瘤移植物对药效的反应常常用于预测所研究的药物是否会有临床效果，即阻止肿瘤继续生长或使其在患者体内缩小的能力。

某些时候，肿瘤细胞簇的体外药物反应性可预测其体内行为，而在另一些时候则不能。一些制药者的经验告诉我们，这一差异性行为与肿瘤细胞系生成的自分泌生长因子有关。那些可以合成大量自分泌生长因子的肿瘤细胞对药物的疗效在体外和体内往往相似，而那些不分泌生长因子的肿瘤细胞则在两种情况下反应截然不同。这似乎说明分泌自分泌因子的肿瘤细胞无论在体内还是体外都可创造出其独特的生长因子环境。相反，那些不分泌生长因子的细胞则在体外依赖于血清相关丝裂原，在体内依赖于附近的宿主细胞分泌的生长因子；后者可能会随血清中丝裂原谱的不同出现显著差异。

5.6　受体酪氨酸激酶作用依赖转磷酸化作用

在细胞如何转化这个问题上，癌基因 *sis* 和 *erbB* 提供了很好的解释。通过对细胞进行持续生长信号的刺激，癌蛋白能够驱动周而复始的细胞生长、分裂，这些都是积累大量癌细胞从而形成肿瘤所必需的。然而，这样的生物学解释回避了一个重要的生物化学问题，那就是促有丝分裂信号的核心：生长因子受体怎样持续传递酪氨酸激酶活性（通常称为酪氨酸激酶受体或 RTK)，成功地将信号从胞外传递到胞内？

众所周知，酪氨酸激酶的酶活性表现靠的是这些蛋白的胞质结构域，这就又重新提出一个问题：生长因子受体怎样利用它们的酪氨酸激酶结构域来发出信号以回应配体的结合？

为了解决这个问题，运用 EGF 生长因子处理能够表达其同源受体 EGF-R 的细胞，几秒后即检测到被磷酸化的蛋白（图 5.13）。这样看来，一系列胞质蛋白的酪氨酸残基在配体与生长因子受体结合后被磷酸化是有原因的。确实，这类蛋白质很多，但是在这些定点磷酸化酪氨酸的促生长蛋白中，这类蛋白质通常本身就是受体分子（图 5.14）。因此，这些受体似乎能够自动磷酸化。

另有来自许多生长因子配体结构的线索表明：它们通常是**二聚体**，形成**同源二聚体**或**异源二聚体**。第三个线索来自很多构造类似 EGF 和 PDGF 受体的跨膜蛋白，它们在质膜平面上具有横向运动性。也就是说，只要这些受体蛋白的跨膜结构域嵌入脂膜双分子层中，它们就可以相对自由地来回通过细胞表面。

综上所述，这些事实说明了一个简单的模型。在没有配体的情况下，一个生长因子受体通常以**单体**（一个亚基）的形式嵌入质膜。生长因子配体为同源二聚体，当其存在

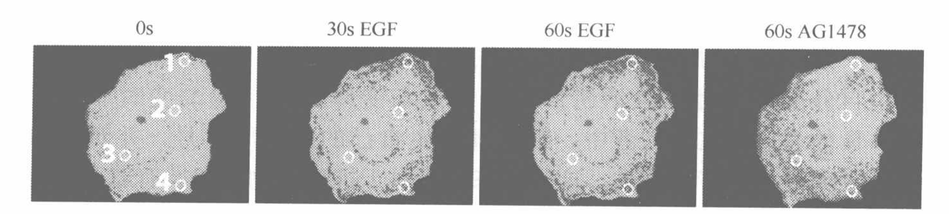


图 5.13 形成磷酸化酪氨酸的表皮生长因子受体后伴随配体的增加 使用一种荧光试剂可以具体地结合到表皮生长因子受体的一个磷酸化酪氨酸残基上，这样在配体结合后有可见的激活受体。在这里，受体活化是衡量一个猴肾细胞处于基础水平（0s）、在 EGF 加入后 30s 和 60s，以及继 2min 表皮生长因子刺激的影响同时在 60s 时用表皮生长因子受体激酶的化学抑制剂处理（AG1478）效果。受体活性高于基础水平显示蓝色，低于基础水平显示红色。用 AG1478 处理的反应表明，甚至在 EGF 加入前，一个重要的基础水平表皮生长因子受体活性是可呈现的（0s）。（From M. Offterdinger et al.，J. Biol Chem. 279：36972-36981，2004.）

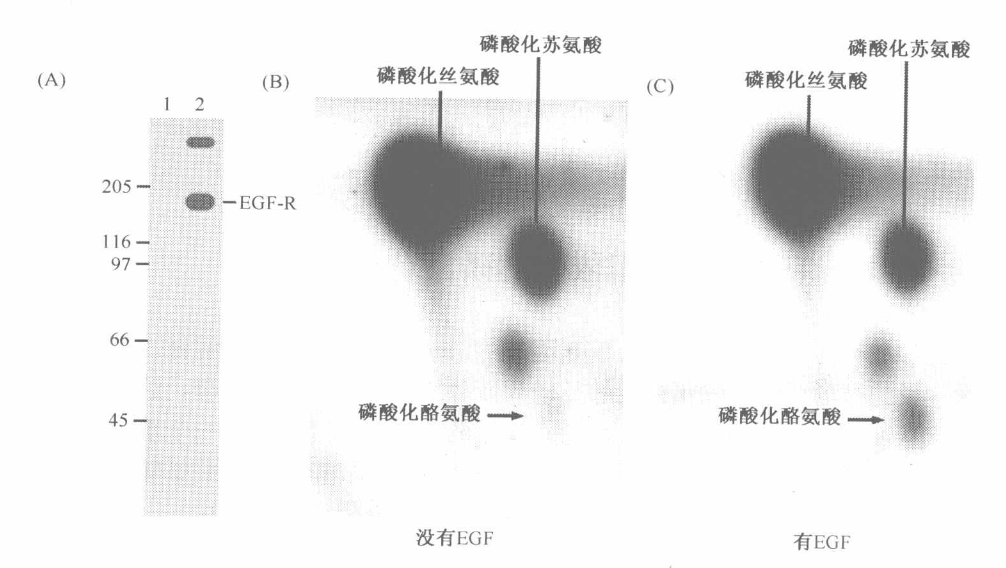
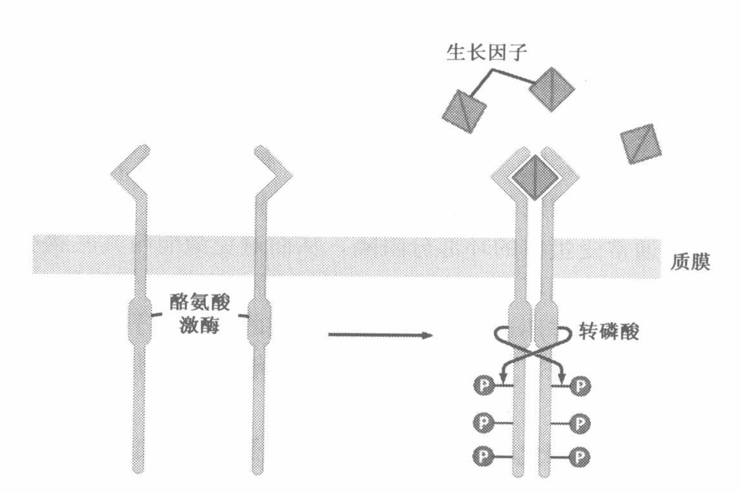


图 5.14 表皮生长因子受体的自磷酸化 （A）含有大量的高表达表皮生长因子受体的人类 A431 表皮癌细胞在含 ^{32}P 的培养基中孵育，然后暴露于表皮生长因子，标记蛋白可与抗酪氨酸磷酸化抗体发生免疫共沉淀作用（泳道 2）；在事先没有表皮生长因子处理时，这种蛋白质在凝胶电泳与表皮生长因子受体共迁移是不显示的（泳道 2）。（B）在缺乏表皮生长因子时，富含由 ^{32}P 标记的磷酸化氨基酸的蛋白质的电泳见图 5.8。（C）伴随添加表皮生长因子到表皮细胞 A431 后，右下方的点变得阴暗；内部标记表明这是磷酸化的酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸。（A，from A. B. Sorokin et al.，FEBS Lett. 268：121-124，1990；B and C，courtesy of A. R. Frackelton Jr.）

时，一个受体分子就会结合在其两个亚基中的一个。其后，配体受体复合物将在质膜上游荡直到有第二次机会遇到另一个受体分子，配体中没有结合受体的那个亚基将和第二个受体分子结合。这样，通过二聚体形式的配体为桥梁，把两个受体分子成功地交叉联系在一起（图 5.15）。X 射线晶体衍射研究表明还有其他机理：当生长因子结合在它们受体的外部结构域，通过这些配体可能诱导受体二聚化（信息栏 5.6）。

图 5.15　受体二聚化伴随配体结合　图显示多少生长因子受体活化并释放出信号。在没有配体时，受体分子（绿色）在横向平面内质膜自由移动。在存在生长因子配体时，两个受体分子聚集在一起，形成二聚体。一旦受体二聚化，每个受体亚基的酪氨酸激酶结构域能磷酸化其他亚基的 C 端胞质——转磷酸化过程（箭头）。



信息栏 5.6　生长因子以各种方式诱导受体二聚化　事实上，简单的受体二聚化模型描绘如图 5.15，代表的行为只有一个亚生长因子受体。这种模式适用于如神经生长因子（NGF）及其受体 Trk 和血管内皮生长因子（VEGF）及其 F1t-1 受体（图 5.16A）。但在成纤维细胞生长因子（FGF），生长因子分子为单体，不直接接触对方。反之，一对 FGF 分子通过结合一个普通肝素分子而连在一起；每个 FGF 单体吸引了 FGF-R 分子，致使其二聚化（图 5.16B）。

其他生长因子为功能单一的多肽链。因此，单个分子的红细胞生成素（EPO）是能够同时接触两种受体分子，从而导致二聚化（未列出）。另有其他配体能以异源二聚化的形式发挥功能，如表皮生长因子受体。两个配体分子（如表皮生长因子或类表皮生长因子受体配体称为 TGF-α）以单体形式结合于类受体，这种结合导致两个这种配体激活受体从而暴露二聚化结构域，外功能区朝向配体结合位点并与另一个无任何关联的两个配体单体结合（图 5.16C）。

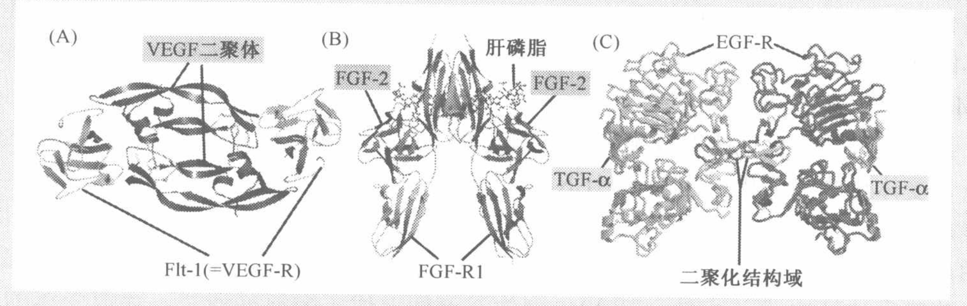


图 5.16　生长因子诱导受体二聚化的替代机制　X 射线晶体学揭示了一些生长因子配体怎样引起受体二聚化。（A）血管内皮生长因子（VEGF）绑定为二聚体（红色、蓝色）以及两个单体受体，称为 Flt-1（绿色），从而使它们组合在一起。这个复合物看作是一个底部视图，即从细胞膜向外看。（B）在成纤维细胞生长因子受体 1（FGF-R1），每个 FGF-配体（暗橙色）结合于一个受体单体的配体结合域（绿、海蓝宝石）。受体亚基的每个配体结合域组成两个亚结构域，如侧视图所示（可见两个绿色结构域互相“躺”在头顶上）。受体二聚化只发生在配体分子结合且有一个肝磷脂结合的情况下（棒图），肝磷脂是细胞外基质的一种黏多糖组分。（C）对于表皮生长因子受体，肿瘤生长因子 α（TGF-α）作为这一受体的一种替代配体，个别结合（绿色，左；紫色，右）于两个受体亚基的“前方”（暗黄色、暗粉红）。如图所示面向质膜，受体单体回应配体结合通过暴露结构域以调解它们的“背靠背”二聚化。因此，每一个生长因子分子其实是远离该区域的受体单体，即直接参与聚合反应。（A，from C. Wiesmann et al.，Cell 91：695-704，1997；B，from A. Plotnikov et al.，Cell 98：641-650，1999；C，from T. P. J. Garrett et al.，Cell 110：763-773，2002.）

一旦两个受体分子的胞外功能区通过配体结合而二聚化，胞质部分通常会被拉到一起。每个激酶结构域磷酸化其他受体的胞质结构域酪氨酸残基。那么何谓“自动磷酸化”（图 5.14 ），其实是名不副实。这种双向互惠的磷酸化作用是最佳的**转磷酸化**过程（图 5.15，事实上，目前还不清楚单一孤立激酶分子是否能够磷酸化自身）。

这些酪氨酸残基的磷酸化至少导致两种现象。激酶催化中心，即蛋白酶活性发生的区域，通常受蛋白的环部分阻隔，从而避免激酶与其底物有效结合。该环的临界酪氨酸的转磷酸化作用可导致它不正常的摇摆，从而打开底物分子通向催化中心的通路。此外，转磷酸化作用还导致不在激酶区域的生长因子受体胞质部分的一系列酪氨酸残基的磷酸化（图 5.15）。这些磷酸化事件能够使磷酸化的受体分子激活一系列的下游信号通路。

受体的二聚化模型解释了生长因子受体分子过表达是如何参与肿瘤的形成，也就是说其在细胞表面的表达水平上远远超过了正常细胞（信息栏 5.3）。因为这些受体可以自由地在质膜上横向移动，它们的高数量引起其间的经常碰撞，这些相遇就像是被配体结合引发的二聚化事件从而导致转磷酸化、受体激活和信号散发。如表 5.2 所示，EGF 受体在人类很多肿瘤中过表达，这些肿瘤主要为恶性癌。在此类肿瘤中，这种过表达可导致配体独立的受体二聚化激活。或者，过多的 EGF 受体表达使一些癌细胞对它们周围低水平 EGF 和 TGF 配体过反应。

通常很难区分这两种替代机制。然而一组实验明确表明，受体过表达可通过第一种机理，即配体独立二聚化实现。在这些实验中，一个基因小鼠品系可过表达人类 Met 受体（其配体为 HGF/SF），导致发展为肝癌（HCC）。在遗传性状改变的组成性受体二聚化肝细胞中过表达，即使没有配体结合，仍然成为有效的癌蛋白。一旦人 Met 受体不能结合小鼠 HGF/SF，该受体激活和细胞转化只能归咎于配体独立进程，特别是过量 Met 受体分子自发二聚化。

各种结构性变化也能造成配体独立的受体二聚化，这样，在没有受体过度表达的情况下，受体仍能二聚化。例如，HER2/ErbB2/Neu 受体是最显著的突变例子，作为一类表皮生长因子受体在某些大鼠肿瘤中发现。暴露于诱变剂乙基亚硝基脲（ENU）的怀孕母鼠，生下的幼鼠往往在 3～6 个月之后趋于患神经肿瘤。肿瘤几乎总是带有点突变在跨膜受体结构域（见图 5.12A）。因为谷氨酸取代了缬氨酸残基，促成受体的组成性二聚化，即使没有配体结合也能形成一种癌蛋白。

如 HER2/ErbB2/Neu 一样，EGF 和 FGF 受体可能因点突变或小缺失产生组成性激活受体；突变改变这些受体的胞质结构域，从而调节受体相关酪氨酸激酶。在一系列非小细胞肺癌中，表皮生长因子受体有不到 10%有突变，而这些却是特别治疗药物所作用的受体分子，位点我们将在第 16.12 节学习。结构改变的受体在膀胱癌中更为常见：至少有 60%以上的肿瘤已发现改变的 FGF 受体 3。其确切机制被截短，突变的表皮生长因子受体缺乏胞外结构域，不能成为组成性地激活（见图 5.11），其机理还不是很清楚。

其他基因改变的酪氨酸激酶受体也可能引起癌。举例来说，Met 作为肝血小板生长因子（HGF）受体，TrkA 作为神经生长因子（NGF）受体，都被发现在某些肿瘤的基因融合现象中转换成为癌蛋白。这些融合导致编码序列的截断，多为受体外结构域和

该受体与其他蛋白质融合的其余部分，使之容易发生二聚体或寡聚化（图 5.17）。这也导致受体组成性配体独立二聚化，解释了这些融合蛋白致癌的能力。但另一方面，受体结构的微妙变化也可以促成配体在不同细胞类型中的独立激活（信息栏 5.7）。

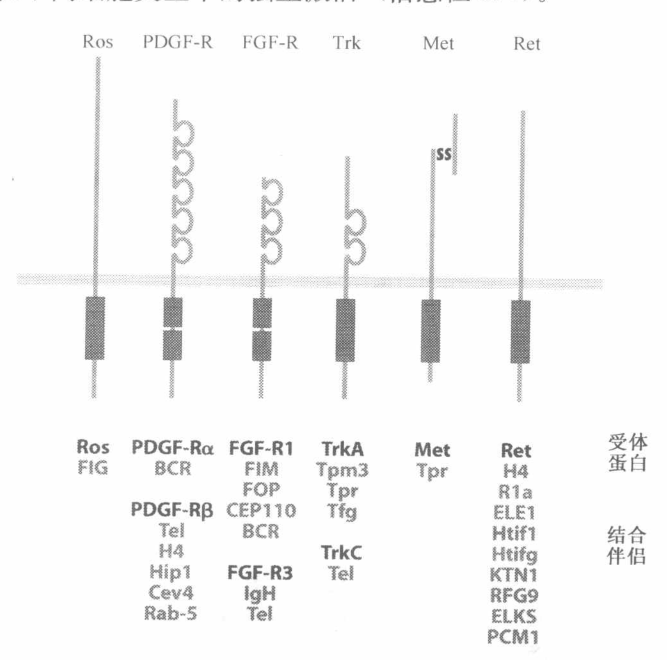


图 5.17　基因融合导致组成性受体二聚化　在一些恶性肿瘤中，当编码生长因子受体（黑色型）的基因和无关的基因成为融合基因形成通常二聚体形式或高阶低聚物（红色型）蛋白质时，受体发生二聚化。结果导致受体的杂交融合蛋白（通常为它们的外结构域）部分由寡聚蛋白质拖到一起。这里列出的都是此类突变体，在人体肿瘤中可发现融合受体；在某些情况下特定的受体可发现融合多重叠合替代蛋白质。(Courtesy of A. Charest.)

虽然我们已经非常重视受体二聚化，但它只是酪氨酸激酶受体分子结合自己配体后分子变化的一种。越来越多的证据表明，除了二聚化，配体结合外结构域也进行某种类型的旋转或立体转移，且这种改变是可以通过这些受体从细胞膜向细胞质激酶域传送信号的，而它本身转变为新结构，从而有利于转磷酸化的进行。事实上，在一些酪氨酸激酶受体中，即使没有配体结合，组成性的二聚化是可能存在的，配体只是使外膜和胞质域的受体分子一致旋转，从而有利于其激酶域传导信号。

信息栏 5.7　单一突变形式的酪氨酸激酶受体可能在不同类型的癌症起着因果作用

Kit 蛋白最初作为猫肉瘤反转录病毒的一个癌蛋白被发现。*kit* 原癌基因编码一个酪氨酸激酶受体，其配体为干细胞因子（SCF），是刺激血液中形成各种类型细胞的一个重要生长因子（**造血过程**），以及发育成其他类型非造血细胞，包括黑色素细胞和细胞介导肠动力。在各种恶性肿瘤，能激活组成性配体独立形式的突变 Kit 受体均有发现。在许多狗白血病中，突变的 Kit 受体在那些靠近**跨膜域**的细胞质近膜残基存在氨基酸替换是很常见的。

肠的起搏细胞，控制平滑肌这个器官的蠕动收缩，也依靠 Kit 受体，而事实上，如果 *kit* 基因在小鼠的生殖细胞中失活，从而在所有细胞中均缺乏。在胃肠道间质肿瘤（GIST）中，似乎也来自这一类细胞，类似于狗白血病的近膜氨基酸替换普遍存在。分析 Kit 受体的结构和相关酪氨酸激酶受体表明，这一受体的近膜域在调节受体方面发挥抑制作用，它能够抑制在这一领域有氨基酸替换和缺失的受体激活，而这在 GIST 中是很常见的（图 5.18）。在一组 GIST 患者中，*kit* 基因存在微小（错义）突变影响其外显子 11 的患者，经过初步诊断和治疗后均存活 4 年，而整个外显子缺失的患者只有一半能存活 4 年。

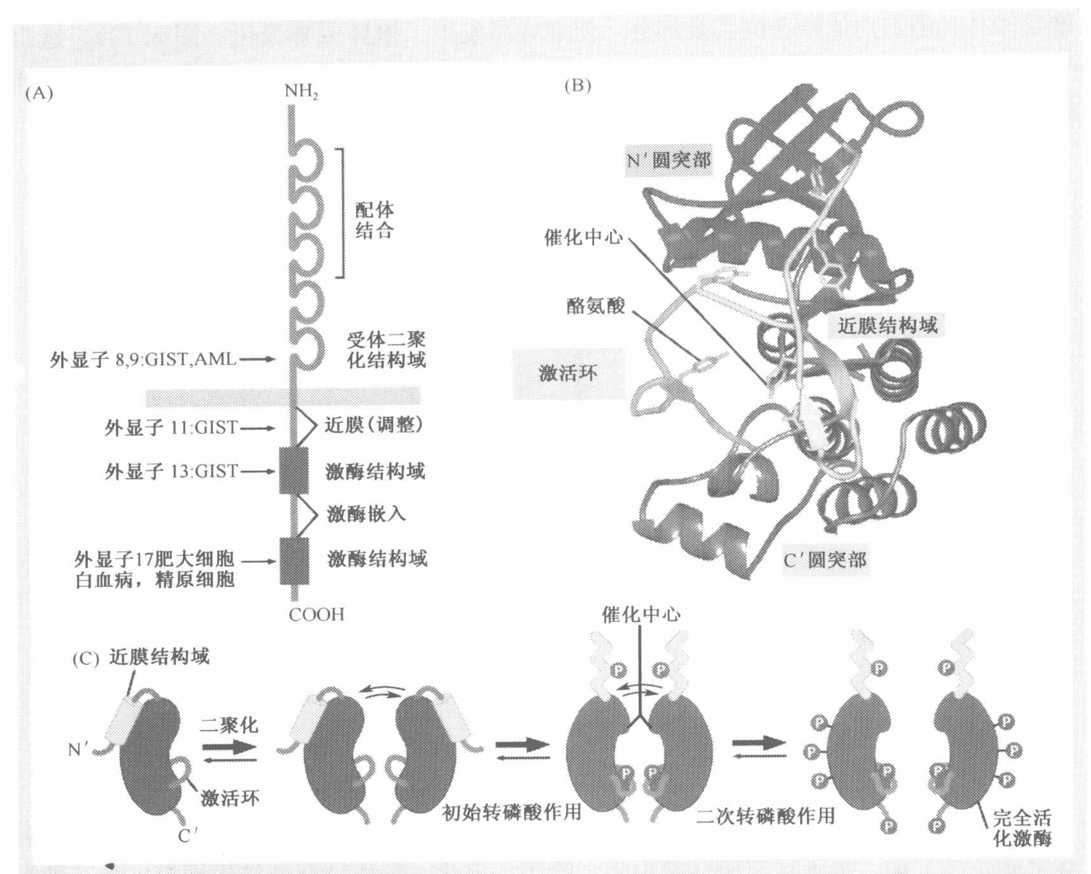


图 5.18　多重结构改变影响 Kit 受体激活　（A）在一些不同类型的人类肿瘤（红字）中，可发现组成型的激活突变形式的 Kit 受体。（B）通过 X 射线晶体学研究发现 Fit-3 受体胞质结构，它和 Kit 有非常密切的关系，表现为带状结构。像几乎所有的蛋白激酶一样，它由 N′圆突部（红色）和 C′圆突部（蓝色）以及中间的催化中心组成。催化中心通常是阻碍“激活环”（绿色）和近膜结构域（黄色）接触的。酪氨酸残基激活环，其磷酸化导致该环不规则旋转，使催化中心接近底物。（C）Kit 受体，其突变形式几乎在所有胃肠道间质肿瘤（GIST）存在，往往伴有结构改变影响近膜结构域（JM），在此表示为黄色圆柱体，位于酪氨酸激酶的 N′圆突部上面［侧视图，质膜（未画出）上面］。配体结合到 Kit 受体，最初导致 JM 域的酪氨酸残基转磷酸化，然后使它从 N′圆突部分离出来；磷酸结构（黄色锯齿），这里描绘为位于激酶结构域上面。在这之后，激活环上的一个关键酪氨酸残基的转磷酸化（绿色），其通常阻碍催化中心（见图 B），也有激活蛋白激酶的功能。突变的 Kit 受体 JM 域缺陷，即使在没有配体结合的情况下，也可部分激活。（A，courtesy of D. Emerson；B，from J. Griffith，J. Mol Cell 13：169-178，2004；C，from P. M. Chan et al.，Mol. Cell. Biol. 23：3067-3078，2003.）

人类基因组测序揭示了有可能在人体组织表达的全部酪氨酸激酶受体。对基因组中大约 22 000 基因，至少有 58 个编码蛋白具有表皮生长因子和血小板源生长因子受体的一般结构，是一种配体结合外膜，属于跨膜域，以及酪氨酸激酶的胞质域。根据其结构相似度，这些受体被进一步分为亚类（见图 5.10）。到目前为止，这些受体只有少数作

为代表被证明能促成人类癌症的形成，也很可能在人类癌症过程中参与这一类其他受体的激活，这都需要以后进一步的研究证实。显然，某些酪氨酸激酶受体基因突变的等位基因，也可能通过人类生殖系传递。这就解释了一些家族癌症症状的起源，其中受影响的家庭成员增加了该类型癌症的患病风险（信息栏 5.8）。

信息栏 5.8　突变的受体基因能通过人类生殖系传递　*ret* 基因编码一种酪氨酸激酶受体，在乳头状甲状腺癌是常见的突变形式，尤其是那些由于临床不慎以 X 射线检查从而暴露甲状腺诱发的。在这些肿瘤，*ret* 基因往往和其他几个基因中的一个发生融合，导致染色体易位（见图 5.17）。结果是 *ret* 融合蛋白以配体独立方式组成性激活。更微小的 *ret* 等位基因突变可以在种系中遗传，而导致称为多发性内分泌肿瘤（MEN）类型 2A 和 2B 的癌症遗传综合征，以及家族性甲状腺髓样癌。

MEN 是一种比较罕见的综合征，发病率为三万分之一。在 MEN-2A 型中，甲状腺是原发灶，几乎所有的患者进展为甲状腺癌。此外，二级转移灶为肾上腺（导致嗜铬细胞瘤）和甲状旁腺（增生或腺瘤）。密切相关的 MEN-2B 型病表现为甲状腺，肾上腺以及肠道的神经节细胞肿瘤风险增加。MEN-2A 型通常起源于一个遗传点突变，造成胞外 Ret 酪氨酸激酶受体替代为半胱氨酸残基。MEN-2B 型是由于这种受体酪氨酸激酶域的一个替换所致。

遗传性乳头状肾癌是由于在 *met* 基因遗传突变的等位基因，其编码为受体肝细胞生长因子（HGF）。*met* 基因的这些突变种系等位基因通常伴随点突变，引起酪氨酸激酶域氨基酸替换，导致受体在配体独立情况下组成性激活。

一个日本家庭成员（图 5.19）已被报道 Kit 受体的突变等位基因可通过生殖细胞传递。例如，*kit* 基因的突变体形式，突变种系等位基因带有突变影响 Kit 受体的近膜域，产生胃肠道基质肿瘤（GIST）。当在小鼠种系中引入一两个拷贝的这种突变 *kit* 基因，小鼠将遗传这一突变的等位基因发育成肿瘤，这在人类 GIST 中是无法区分的。

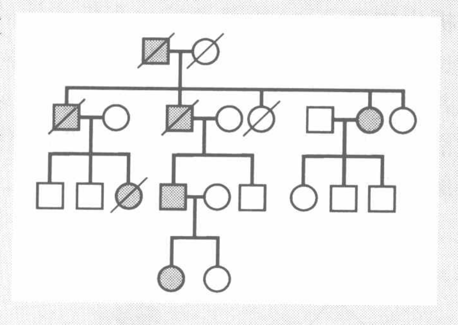


图 5.19　家族性胃肠道间质瘤　胃肠道间质瘤起源于下消化道的间叶起搏细胞，并与来自腔肠的上皮细胞内层且更为频繁发生的结肠直肠癌形成对比。在这里有一例家族描述：一个等位基因编码一种突变体，组成性活化 Kit 酪氨酸激酶受体已至少遗传了四代，困扰他们的是 GIST 和（或）肠阻塞。这一突变等位基因的传递使受体蛋白的近膜域有单个氨基酸残基缺失（见图 5.18），通过这么多代，这个突变种系等位基因表型常常延迟至生育期后才表达。受影响的个体（红色）；“男性”（方形）；“女性”（圈）；“已故者”（画斜杠）。(From T. Nishida et al., Nat. Genet. 19: 323-324, 1998.)

在这里用癌症综合征形容是与众不同的。因为绝大多数此类综合征涉及生殖系突变基因，从而导致在细胞水平上形成失活的隐性等位基因。这些被列入抑癌基因的等位基因，将在第 7 章和第 12 章 DNA 修复基因中进一步讨论。看来，照一般情况来看，突变组成性活性癌基因不能存在于生殖细胞中，因为它们的功能在细胞水平上优于其等位基因，并因此对正常胚胎的发育具有高度破坏性。目前，隐性等位基因的单拷贝在生殖细胞中是可以容忍的，但是，只有幸存的野生型显性等位基因丢失，它们在细胞中的存在才变得明显。由于这种丢失很少发生，癌症诱导型的表达被延迟

直到发育的晚期。

以上所列的酪氨酸激酶受体基因的显性等位癌基因，似乎必须符合合理的正常发育，因为它们的表达（如 *ret* 和 *kit* 基因）只限于一部分组织，甚至可能会在胚胎期被延误，使胚胎正常发育免受这些促生长等位基因破坏性的影响。

在 2005 年，关于一种罕见的癌症家族综合征的遗传表征的报道打破了这种逻辑，相反于预想，H-*ras* 前癌基因突变活化的等位基因存在于一个受精卵，这和合理正常的人类发育不相符。个体如果遗传了这些等位基因，则患婴儿猝死综合征，这种病的特点是智障，出生体重高，**心肌病**（病理缺陷的心脏肌肉），并有发展为肿瘤的趋势。这些个体不能存活至成年（这也解释了为何 12 例描述的患者全部为二次突变，即新的突变在形成一个精子或卵子的过程中产生，而不是遗传于被困扰的父母）。引人注目的是，这些个体的大部分器官系统发育相对正常，尽管在其所有细胞存在着一个激活的 H-*ras* 癌基因的高度渗透等位基因（见第 4.4 节）。

5.7 其他类型的受体使哺乳细胞与环境进行沟通

到 20 世纪 80 年代，已经发现了一些不同类型的后生动物受体。这时，人们才清楚酪氨酸激酶受体（RTK）只是代表了结构各异的众多受体的一种，这些受体都使细胞能够“感知”它们周围的生化状态。和酪氨酸受体一样，其他的受体也是特异的识别一个或者一组配体，结合好之后信号就被转换到细胞质。

有一种受体也是利用酪氨酸激酶，它调控各种各样造血细胞类型的发育，在接受这种信号的过程中至关重要。在这个过程中，主要负责的酶，称作 Jaks（Janus kinases 缩写），是独立的多肽，和细胞质的这些受体非共价连接。这里面包括前面说过的促红细胞生成素受体和促血小板生成素。促红细胞生成素 EPO 调控红血球的生成，而**促血小板生成素** TPO 则是调控血小板前体的生成，称为**巨核细胞**。重要的免疫调节剂干扰素也是这类受体的成员。当这一类受体分子二聚化以回应配体结合，相关的 Jaks 磷酸化并激活对方（图 5.20 ）。激活的 Jaks 随后磷酸化受体分子的 C 端尾部，从而使受体激活释放信号，就像前边章节描述的酪氨酸激酶受体。我们将在下一章讲解 Jak 信号通路的细节。

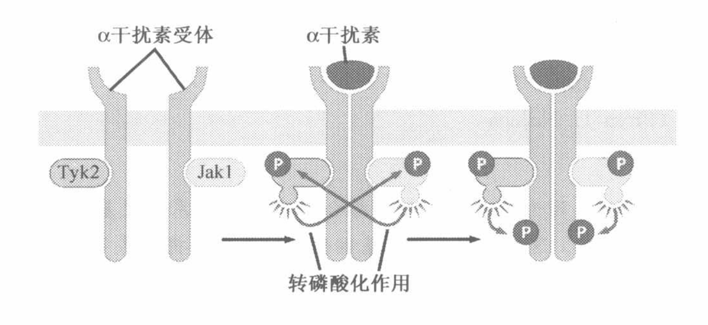


图 5.20 细胞因子受体结构 干扰素受体（IFN-R，深绿），像红细胞和血小板受体一样，非共价键连接 Jak 家族的酪氨酸激酶（TK）（在这种情况下为 Tyk2 和 Jak1）。当配体结合（在 α 干扰素存在的情况下），两个 TK 转磷酸化来激活彼此。接下来，它们磷酸化受体亚基的 C 端尾部，使受体处于一个活化信号形式的构象，就像在第 5.6 节描述的受体酪氨酸激酶。

转化生长因子-β（TGF-β）及相关配体的受体，表面上是类似的酪氨酸激酶受体，即它们有一个细胞外配体结合域、跨膜域和细胞质激酶域。但是，这些受体总是以异源二聚化发挥功能，如I型复合物和II型TGF-β受体（图5.21）。重要的是，它们的激酶域磷酸丝氨酸和苏氨酸，而不是酪氨酸残基。TGF-β在癌症发病机理上发挥重要作用，因为它们抑制正常上皮细胞的增殖，同时促进已经转化细胞获得侵袭能力。当配体结合于含有一个组成性活化丝氨酸/苏氨酸激酶的II型TGF-β受体亚基，使得与I型TGF-β受体亚基接近，然后磷酸化。属于I型TGF-β受体亚基的激酶，其激活导致磷酸化要迁移到细胞核的胞浆蛋白，从而激活某些靶基因（图5.21）（一连串的TGF-β相关因子，包括激活素和骨形成蛋白，或BMP利用类似的受体信号；这里没有进一步讨论，因为它们在癌症的发展过程中的作用并未记载）。我们将在第8章更详细讨论TGF-β信号系统。

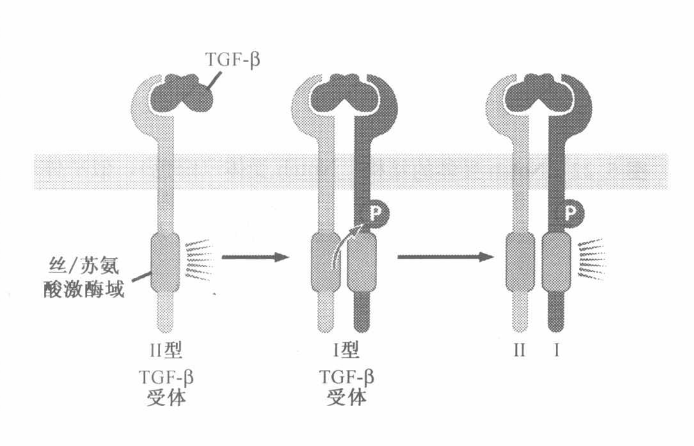


图5.21 转化生长因子β受体的结构 转化生长因子β受体的结构表面类似酪氨酸激酶受体（RTK），这两种类型的受体信号均通过细胞质激酶域。然而，TGF-β受体的激酶域特定的磷酸化丝氨酸和苏氨酸，而不是酪氨酸残基。当II型受体（TGF-βRII）通过结合TGF-β配体来接触I型受体（转TGF-βRI）后，它可以磷酸化并激活I型受体携带的激酶。活化的I型受体激酶通过磷酸某些细胞质底物来释放信号。

跨膜信号传递系统更为原始的形式体现为Notch受体（简称为Notch）及其多种替代配体（NotchL、Delta、Jagged；图5.22）。配体结合后，Notch被两个蛋白酶成功切开，其中来自其胞质域的一个水解为Notch片段，然后迁移到细胞核，作为一转录因子复合物的一部分激活表达一系列应答基因。Notch信号通路似乎在Ras介导的细胞转化过程中发挥作用，并参与了一些形态发生过程。Notch的突变体，组成性活化形式能在配体独立的情况下活化，在一半成人T细胞白血病中被发现。

另一个称为Patched的受体，是构建来回通过质膜的多个跨膜结构域（图5.23）。当Patched配体——Hedgehog蛋白（Hh）结合Patched（Ptc）时，后者远离第二孔跨膜蛋白质称为Smoothened（Smo）。然后，Smoothened信号使细胞浆复合物释放转录因子，而后者转运到细胞核，在那里它能够激活Hedgehog的靶基因。Ptc和Smo的突变等位基因在常见的皮肤基底细胞癌中被发现，以及Ptc突变等位基因在成神经管细胞瘤中也有发现；我们在第16章会再讨论这一类肿瘤。

Wnt信号代表另一个独立的信号系统。如前所述，其发现追溯到了果蝇的突变基因Wingless及相关小鼠基因（称int-1）；后者被发现是由于小鼠乳头瘤病毒插入造成突变（见信息栏3.8）。Wnt信号蛋白质紧紧包围细胞外基质（ECM），并通过一个脂尾

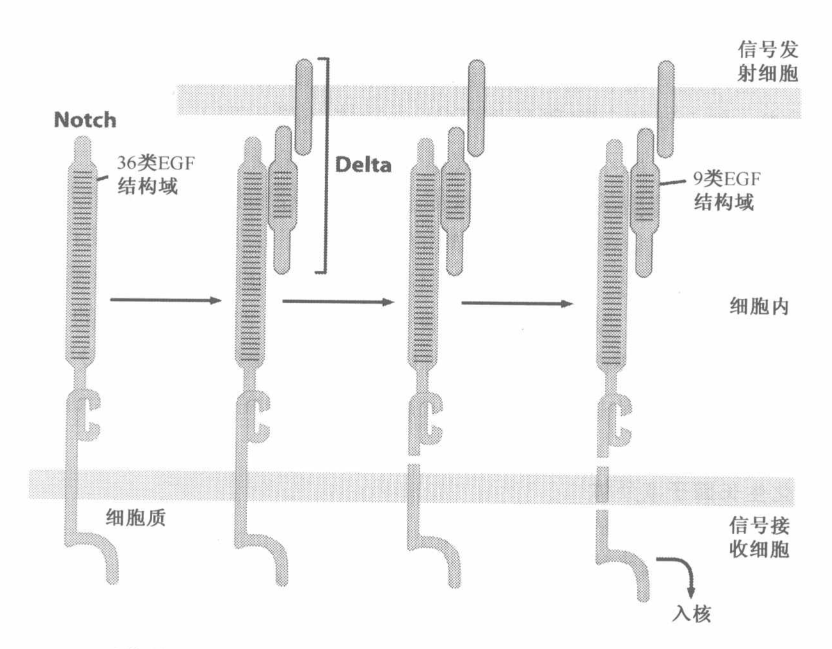


图 5.22 Notch 受体的结构 Notch 受体（绿色），似乎体现了一类非常原始的信号。当它结合于相邻细胞表面的配体后（如 NotchL，即 Delta，粉红），Notch 经过连续两个蛋白酶水解，C 端细胞质片段获释，迁移到细胞核，从而改变某些基因的表达。

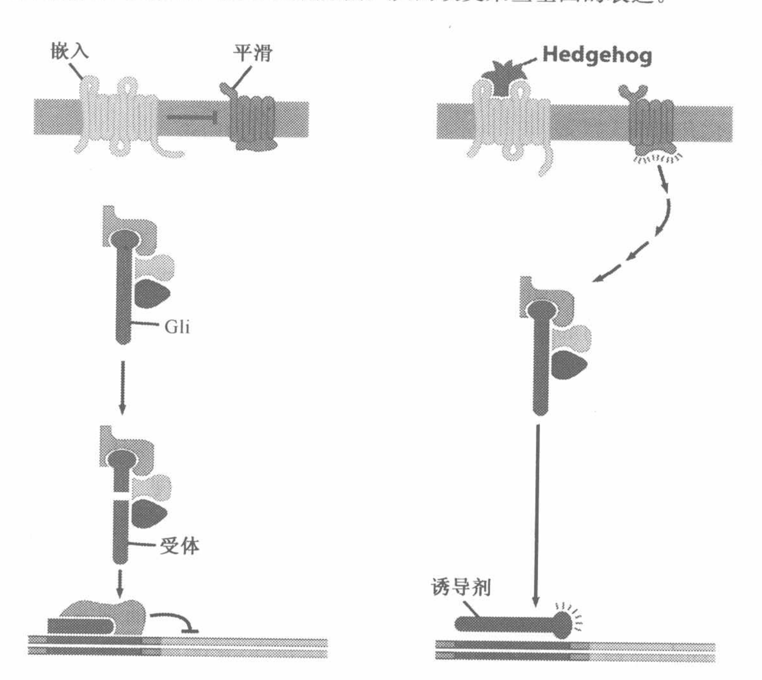


图 5.23 Patched-Smoothened 信号系统 Hedgehog 通路有自己独特的信号系统。通常，Smoothened，一个七孔跨膜表面受体（墨绿色），是无活性的，受 Patched 抑制（淡绿色），Patched 包含 12 个跨膜域（左上角）。这种条件下，Gli（红色）被裂解成一种能进入细胞核的蛋白质，在那里它作为转录抑制剂（左下方）。然而，当 Hedgehog 配体（红，右上）结合 Patched，后者改变对 Smoothened 的抑制作用。然后 Smoothened 以一些未知的方式活化，防止 Gli 水解，使 Gli 进入细胞核，在那里可以作为一种诱导转录剂（底部右）。

包围细胞膜，因此似乎和我们前面所讨论的个别生长因子不同，其不能随意扩散（见信息栏 5.9）。Wnt 信号激活跨膜受体 Frizzled 信号（Frz）家族，如同 Patched，是复杂的多螺旋跨膜受体（图 5.24）。当没有 Wnt 信号时，细胞质糖原合酶激酶 3β（GSK-3β）磷酸化几个促增殖蛋白质，包括 β-catenin，使其降解。但是，当 Wnts 结合到 Frizzled 受体触发一系列级联反应，关闭 GSK-3β 活化，让这些蛋白质逃脱降解从而促进细胞增殖。这个途径在癌症发病中起着至关重要的作用，我们将接下来几个章节详细讨论。

信息栏 5.9　生长因子如何穿越细胞间隙？　本章关于生长因子的讨论意味着这些蛋白质一旦被细胞分泌，就自由地弥散在细胞间，直到它们达到其预定目标，即其他细胞呈现同源细胞表面受体。事实上，许多生长因子分子，也许是绝大多数，从合成它们的细胞释放后不久就成为附在胞外基质（ECM）的组分。ECM 是一个复杂的网状分泌糖蛋白和**黏蛋白**，填充了大部分的细胞间隙，并为组织提供一定的结构刚度：下面我们就会更详细了解 ECM（5.8 节）。

许多类型的分泌生长因子装饰 ECM 就像用饰物装饰圣诞树一样。这种生长因子可能长时间地在 ECM 范围内以非活动形式存在，并可能随后从 ECM 释放，转化为可溶性、激活的因子。细胞释放这些来自 ECM 范围的生长因子，表现就像动物在灌木寻找食物。这些细胞通常利用分泌蛋白酶来动员其范围内的生长因子。也可呈现出受体，来应对生长因子。

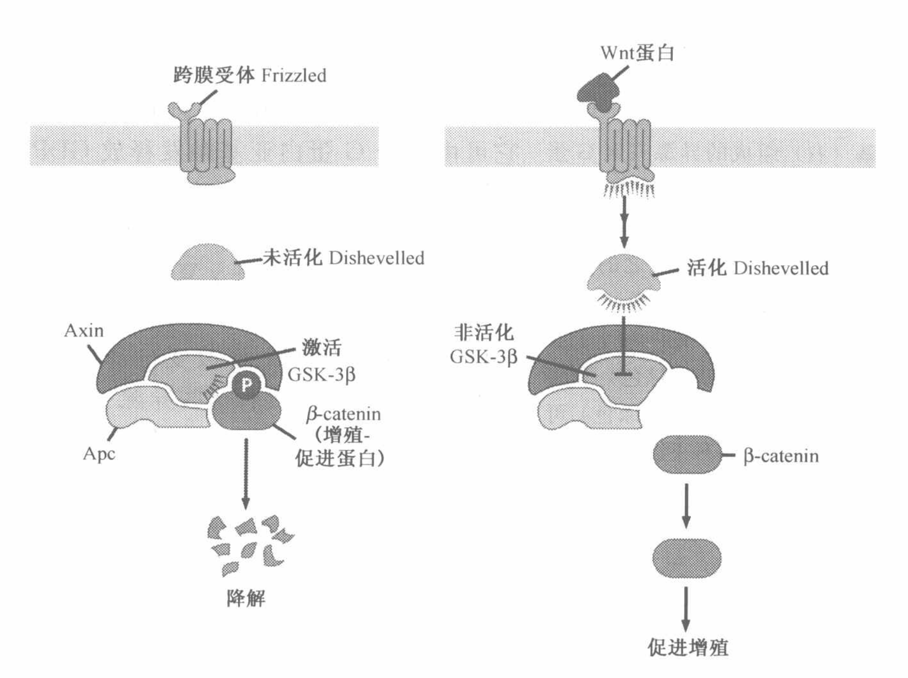


图 5.24　Frizzled 信号受体　Wnt 蛋白受体是跨膜蛋白 Frizzled（Frz）家族的成员。在没有配体结合时（左），Axin（棕色）和 Apc（淡绿色）复合物允许糖原合成激酶 3β（GSK-3β，粉红）使 β-catenin（蓝色）磷酸化。这标志着 β-catenin 被蛋白酶水解并迅速降解。然而，当 Wnt 配体结合到一个 Frizzled 受体（右），由此启动 Frizzled 受体，通过 Dishevelled 蛋白（淡绿色），抑制 GSK-3β。这样剩下的 β-catenin 有可能积累并促进细胞增殖。

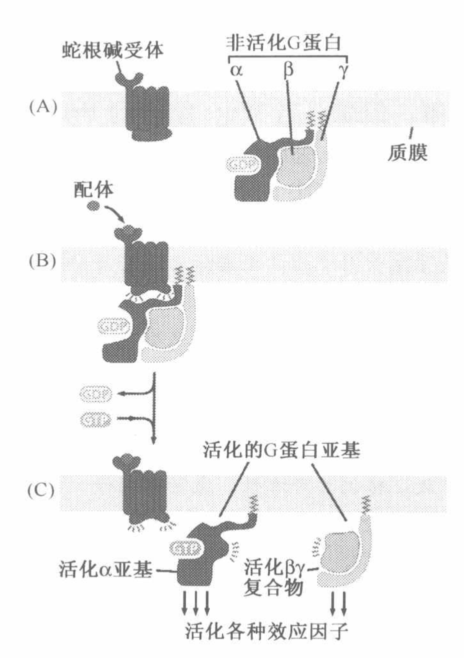


图 5.25 七次跨膜受体信号 (A) 七次跨膜（serpentine）受体（左）与 α、β、γ 亚基（右）组成的异源三聚 G 蛋白。(B) 一旦受体结合其同源配体（红色），刺激 G 蛋白的 α 亚基释放 GDP（二磷酸鸟苷），取而代之的是结合 GTP（三磷酸鸟苷）（浅蓝色）。(C) 由于这部分反应，α 亚基从 β ＋ γ 上游解离下来。然后，α 亚基（棕色）和独立的 β＋γ 复合物（蓝色，淡绿色）可自行调节酶从而诱发多种下游反应。当 α 亚基水解 GTP，它与 β＋γ 复合物重新结合，信号则被终止（未显示）。

最近一项人类基因组序列调查显示，除了酪氨酸激酶受体，11 个类转化生长因子 β 受体，4 个 Notch 受体，一个或两个 Patched 受体和 10 个 Frizzled 信号受体之外，可编码的蛋白质远远多于像 Patched 和 Frizzled 蛋白这一类跨膜螺旋受体。像 Frizzled 这一类受体，有时也被称为“七次跨膜蛋白”，因为它们像蛇形结构，来回穿越细胞膜恰好七次（图 5.25）。伴随配体结合，信号传递激活细胞质中的 G 蛋白（缩写为鸟嘌呤核苷酸结合蛋白质），常被称为 G 蛋白偶联受体（GPCR）。在哺乳动物的基因组有超过 1000 种不同编码类型的 GPCR。这些受体多参与鼻子嗅觉、口味、视网膜光子探测、脑神经递质检测。总而言之，目前为止，编码这些受体的基因在人类基因组中几乎占总数的 5%。

当 G 蛋白被 GPCR 刺激后，其作为二元开关，在 GDP 和 GTP 结合态中来回改变。这些 G 蛋白结构复杂，它们由 α、β、γ 亚基组成异源三聚体。如图 5.25 所示，一旦 GPCB 结合其配体，它可由一个 G 蛋白亚基触发释放 GDP，并结合 GTP，对该过程受体结构的改变还知之甚少。亚基从 β＋γ 上游离下来，并同其他**效应蛋白**结合来向细胞内传送信号；β＋γ 复合物可能也与自己下游效应蛋白结合。最终，α 亚基通过水解结合的 GTP（转化为 GDP）来改变自身结构并和 β＋γ 重新聚集在一起。然后这些异源三聚物恢复为失活，非信号状态，从而等待再次配体活化的 GPCR 信号。迄今为止，这些受体尽管数目庞大，但只有在极少数的人类癌症中发现能导致发病（第 6 章加以描述）。

5.8 整联蛋白受体连接细胞和细胞外基质

关于正常细胞和转化细胞的研究为认识另一类型细胞表面受体提供了线索，即专门负责向细胞外传感的一类分子。转化细胞的重要属性就是能够回复不受限制的生长能力，即在无固体基质的条件下继续增殖，如培养皿的底部（见第 3.5 节）。这种行为与正常细胞形成反差，正常细胞需要固体基质来增殖。实际上，在没有固体基质时，许多类型的正常细胞会启动一种被称为无基质凋亡的**程序性死亡**（**细胞凋亡**）（将在第 9 章详细探讨）。

固体基质的生化分析表明，即细胞黏附于培养皿的底部，非常大的一部分细胞并不直接停靠到玻璃或塑料表面。相反，它们通常黏附在类似细胞外基质（ECM）的复杂分子网络，在大多组织的细胞间可发现。ECM由一系列糖蛋白，包括胶原、层粘连蛋白、蛋白聚糖和纤连蛋白（图5.26）。细胞进入培养皿，它们将分泌黏附玻璃或塑料的ECM组件；一旦ECM分泌完成，细胞附着到它们自己的这种基质。因此，对锚定的依赖度真实反映了正常细胞为了生存和增殖对周围ECM组件的需要。

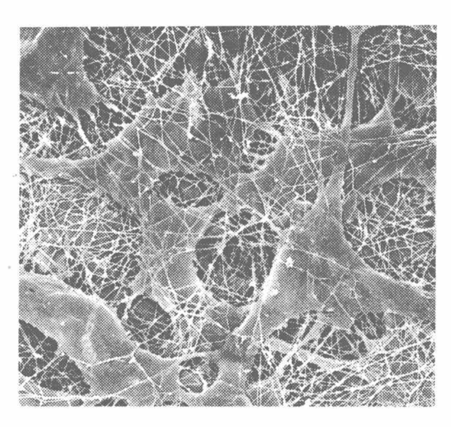


图5.26 细胞外基质 这一电子显微照片扫描结果表明，有专门细胞外基质（ECM）嵌入的成纤维细胞存在于角膜（老鼠）。该ECM的许多组分，包括糖蛋白、透明质酸、蛋白多糖和被移走以突出ECM的主要组分——胶原纤维。（From T. Nishida et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29：1887-1890，1988.）

锚定依赖的特性使细胞能够明显感觉它们是否已成功连接到ECM。据称，在20世纪80年代中期，这种传感取决于专门的受体，这种受体能告知细胞ECM的大约范围和ECM有关的具体分子组分（如胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白）以及发生的范围。这种传感即使不是全部也在很大程度上是通过一个专门类细胞表面受体（称为**整合**）来完成的。实际上，ECM的分子组成作为整联蛋白受体的配体。同时在组织中，整联蛋白通过周围细胞形成了机械稳定性，通过ECM形成脚手架。

整联蛋白构成一个异源二聚跨膜细胞表面受体大家族，该受体由α和β亚基组成。至少18个α亚基和8个β亚基已经列举；合计24个独特的异源二聚体已众所周知。这些受体的外功能区结合具体的ECM组分（图5.27）。表5.4表明，每个整联蛋白异源二聚物在结合具体ECM分子或ECM组分的一个小的亚组分方面显示出特异性。举例

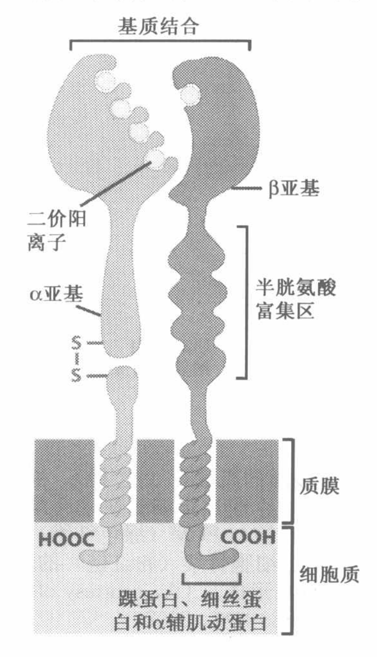


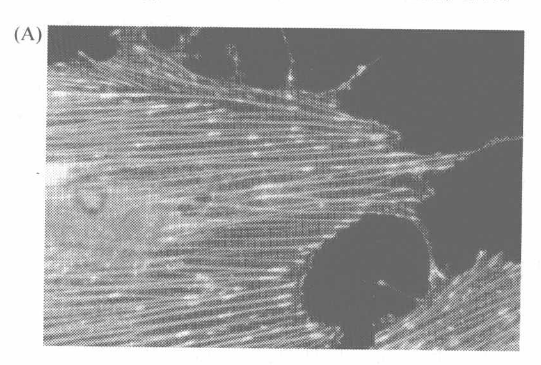
图5.27 整联蛋白的结构 整联蛋白分子形成细胞表面异源二聚体受体，每个受体分别包含一个α亚单位和一个β亚单位（绿色，蓝色）。这些受体的胞外结构域与细胞外基质（ECM）的特定成分相连接。同时，胞内结构域（主要是β亚单位部分），通过中间蛋白与细胞骨架相连接（主要由肌动蛋白纤维组成）；此外，胞内结构域可能还吸引了一系列信号转导蛋白，当胞外结构域与ECM配体相连时即可将之激活。

来说，人们所研究的 α5/β1 整联蛋白，主要是纤连蛋白的受体，是脊椎动物组织中 ECM 组分的一个重要糖蛋白。层粘连蛋白是大且多结构域的 ECM 分子，已报道可与多达 12 个独特的整联蛋白异源二聚体结合。

表 5.4　整联蛋白及其胞外基质配体举例

整合素	胞外基质配体	整合素	胞外基质配体
α1β1	胶原蛋白、层粘连蛋白	α6β1	层粘连蛋白
α1β1	玻璃粘连蛋白，纤连蛋白	α7β1	层粘连蛋白
αvβ1	玻璃粘连蛋白,纤维蛋白原,血小板反应蛋白	α2β3	纤维蛋白原
α5β1	纤连蛋白	α6β4	层粘连蛋白-上皮，半桥粒

部分改编自 B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; and from H. Lodish et al., Molecular Cell Biology. New York: W. H. Freeman, 1995.



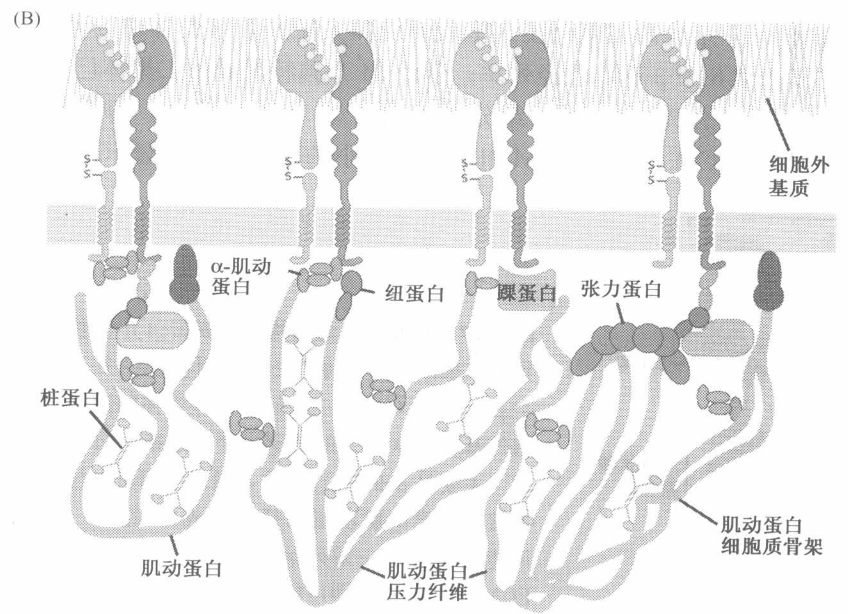


图 5.28　ECM 和细胞骨架的整联蛋白　(A) 荧光显微镜表明细胞表面的离散灶（黄/橙），称为成簇黏附，细胞利用它们周围的整联蛋白整合到细胞外基质（ECM）。这个簇也影响到肌动纤维（绿色）形成细胞骨架。(B) 整联蛋白的组织（绿色，蓝色）示意图表示它们与 ECM（绿色纤维）的联合，通过其外功能域及其胞质域和每个异源二聚物的 β 亚基与肌动蛋白细胞骨架（粉红链）的联合。一系列的中介蛋白质，如肌动蛋白、纽蛋白和踝蛋白，使这些联系得以形成。(A, courtesy of Keith Burridge; B, adapted from C. Miranti and J. Brugge, Nat. Cell Biol. 4: E83-E90, 2002.)

通过它们的外功能区结合其 ECM 配体，整联蛋白成簇黏附（图 5.28A）。这个成簇现象潜在地影响质膜骨架，因为一些整联蛋白通过其胞质域直接或间接地和细胞骨架的重要成分联系起来，如肌动蛋白、纽蛋白、踝蛋白和桩蛋白（图 5.28B）。成簇黏附的形成也可能造成整联蛋白的胞质域激活引起多种细胞反应的信号通路，包括细胞迁移、增殖和生存，如启动释放抗凋亡信号，整联蛋白减少无基质凋亡。在肿瘤的发展中，这些整联蛋白的功能被陆续鉴定（信息栏 5.10）。

信息栏 5.10　一些整联蛋白对肿瘤发生是必不可少的　在靶组织中选择性失活（“敲除”）的基因能够评估各种信号蛋白在肿瘤发生中的贡献。举例来说，在小鼠种系编码 β1 整联蛋白基因灭活导致胚胎死亡；但是，引入一个“条件”下等位基因到小鼠生殖系，使这个基因专门在上皮细胞小鼠乳腺灭活（图 5.29A，B）。这种 β1 整联蛋白基因的两个拷贝失活对乳腺发育的作用已微乎其微。但如果在这些小鼠的乳腺组织中表达多瘤病毒的 MT 癌基因，通常观察癌前增生结节减少超过 75%和 β1 整联蛋白阴性细胞完全无法得到进一步发展从而形成乳腺癌（图 5.29C）。详细分析表明，这个 β1 整联蛋白表达缺失允许癌基因在乳腺上皮细胞表达并存活，但它们排除了活跃增殖。这表明，在个别静脉，即使干扰 β1 整联蛋白表达或功能，可有效阻断人类某些类型肿瘤的发展。

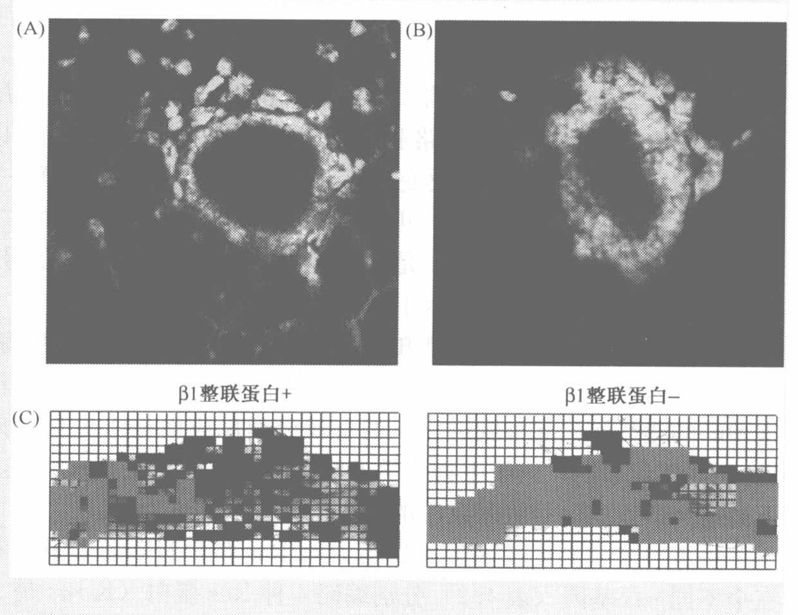


图 5.29　β1 整联蛋白与乳腺的肿瘤发生　基因编码的 β1 整联蛋白的选择性灭活在小鼠乳腺的试验，表明其在肿瘤发生中重要性。（A）细胞中免疫染色 β1 整联蛋白为红色的可形成小鼠乳腺导管（蓝色）。（B）当没有 β1 整联蛋白时，导管形态仍正常发生。此外，乳腺的整体发展正常（未列出）。（C）通过乳腺镜检发现，转基因小鼠容易发生乳腺肿瘤（左），癌前增生性结节，在这些腺体（红色正方形）的正常上皮中大量存在（黑色正方形）。然而，在 β1 整联蛋白表达缺陷的（右）大部分上皮细胞中，这些结节的绝大多数未能形成乳腺。（From D. E. White et al.，Cancer Cell 6：159-170，2004.）

在另一个方面，整联蛋白是最不寻常的。我们通常认为受体从细胞外向细胞质传递信息。整联蛋白也可这样做。此外，起源于细胞质的信号是用来控制整联蛋白的结合亲和力以至结合其 ECM 配体。这种“由内向外”的信号使细胞来调节自身与各类 ECM 或与 ECM 各种接触点的结合，打破现有的接触并塑造自己的新地位。细胞外接触的快速调节使细胞摆脱组织内的一个微环境进入另一个，并横贯体外的 ECM。成纤维细胞缺乏成簇黏附激酶（FAK），一种协调与整联蛋白的细胞质域有关的信号分子，从而无法重塑自己的成簇联络并缺乏运动性，表明由 FAK 调控的整个细胞质的信号转导对细胞骨架的重塑有重要作用，此结构使细胞的形状改变并迁移。我们在第 14 章将讨论细

胞的运动性在癌细胞的侵入和转移过程中是怎样一种至关重要的能力。

这些各式各样的酪氨酸激酶受体和整联蛋白是哺乳动物细胞利用专门的细胞表面受体来感受细胞外分子的两个非常不同的类型。一些受体，如 EGF 和 PDGF，感应可溶性（或溶解）的生长因子，然而，主要是整联蛋白，感应基本上不溶的 ECM 的脚手架。总的来说，这些受体使正常细胞在进行细胞生长和分裂前确定是否两个前提条件得到满足：细胞必须感应到在其周围有足够量的促生长因子和足够的 ECM 锚定点。

如果一个细胞有活化 *ras* 癌基因，细胞增殖的两项必备要求则无效。因此，*ras* 转化细胞可在较低浓度的血清和血清相关促生长因子的条件下生长；此外，在许多类型的 *ras* 转化细胞能够在贴壁独立性的条件下增殖。这些行为表明，在某种程度上，Ras 癌蛋白是能够通过配体激活生长因子受体和参与 ECM 组件的整联蛋白来模仿信号导入细胞。根据对上述各种信号生化基础的理解，发现需求一些更深入的对 Ras 癌蛋白结构与功能的研究。所以，我们追溯到 80 年代初看 *ras* 癌功能之谜是如何解开的。

5.9　Ras 蛋白作为信号级联反应的下游因子，发挥 G 蛋白类似的功能

有丝分裂信号通路中（第 5.4 节和 5.3 节）两个癌基因 *erbB* 和 *sis* 的发现，为把已知的癌蛋白 Ras 联系到该通路起到了重要作用。*ras* 癌基因可以引起细胞发生和 *src*、*erbB* 和 *sis* 转化细胞相同的改变。那么，是否细胞内存在这样一个桥联的信号通路，使得信号从蛋白 A 传给蛋白 B，再由蛋白 B 传给蛋白 C 呢？如果真的存在，是否 Ras 蛋白处于 *erbB* 和 *sis* 的下游呢？是否有这些多种蛋白质传递的信号最终都集中在假设的信号级联反应末端的共同靶基因上呢？

在生物化学水平，我们都知道生长因子配体活化酪氨酸激酶受体，这些受体胞质区的酪氨酸激酶结构域被活化。但是当受体被磷酸化之后，什么蛋白质又会受到影响呢？这种磷酸化如何引起细胞进一步的有丝分裂反应而进入生长和分裂的活性期？早在 19 世纪 80 年代早期，由于生物化学方法无法提供有效的研究工具，对于酪氨酸激酶受体下游这个假设的信号级联反应的深入研究曾经一度停滞。

一直以来，人们投入了大量精力对 Ras 蛋白进行生物化学研究。哺乳动物细胞中三个不同 *ras* 基因（表 4.2）分别编码 4 种 Ras 蛋白（K-*ras* 是 Ras mRNA 前体的二级剪切蛋白）。由于这 4 种 Ras 蛋白拥有几乎相同的结构和功能，在以后的讨论中，我们统称其为“Ras”。它们的 C 端都黏附有法呢基（farnesyl）、棕榈酰或焦膦酸酯（或者它们中的数个组合）组成的脂质尾巴。这个脂质尾巴可以使 21kDa 的 Ras 蛋白锚定在细胞膜的胞质面。

许多年里，人们一直认为这种膜锚定是通过多个脂质体尾巴直接插入到细胞脂质双层体膜的疏水基团中得到的。但是，近来研究发现，其实更复杂。以 H-Ras 为例，棕榈酸酯的确直接插入到细胞膜胞质面，但它的法呢基基团却是插入到一种特殊的法呢基结合蛋白的疏水口袋中。这样，就易于 H-Ras 和其他伴侣蛋白的相互作用，同时也增强了 H-Ras 蛋白对各种膜的结合能力。

就像异源三聚体 G 蛋白一样（第 5.7 节），Ras 可以结合并水解（如剪切）鸟苷酸。

这种类似 GTP 酶的作用是和 Src、erbB 的酪氨酸激酶作用完全不同的。但有趣的是，这三种癌蛋白对细胞行为的影响却极为相似。

通过与 G 蛋白的进一步比对，我们发现：①Ras 蛋白处于静止，非活化状态时，结合一个 GDP 分子；②上游信号级联反应传来刺激信号后，Ras 蛋白释放 GDP，③在原 GDP 位置结合 GTP；④当结合了 GTP 之后，Ras 蛋白就转化为活化的，可以传递信号的构象；⑤一小段时间后，Ras 自身的 GTP 酶发挥功能，剪切 GTP，从而使自身再一次回到非活化的，不能传递信号的构象（图 5.30）。因此，Ras 蛋白就像一个电灯开关，能在预定的时间自动打开和关闭。

详细地说，我们假设的信号传递链是这样的：由酪氨酸激酶受体通过某种方式传递过来的有丝分裂信号，激活了一种鸟苷酸交换因子（GEF），于是活化的 GEF 就使静止的 Ras 蛋白舍弃 GDP 结合 GTP 而活化，活化的 Ras 蛋白就把信号发送给下游未知的靶群。当 Ras 水解它结合的 GTP 后，这个信号传递过程便宣告结束，Ras 蛋白也回复到静止状态。在信息栏 5.11 中，我们将会提到一组叫做 GTP 酶活化蛋白的蛋白质，可以激活并促进 Ras 蛋白顺利水解 GTP。图 5.30 说明 Ras 作为一个信号传递蛋白，可以接收信号传递级联反应中的上游信号，并且把信号发送到信号通路的下游。

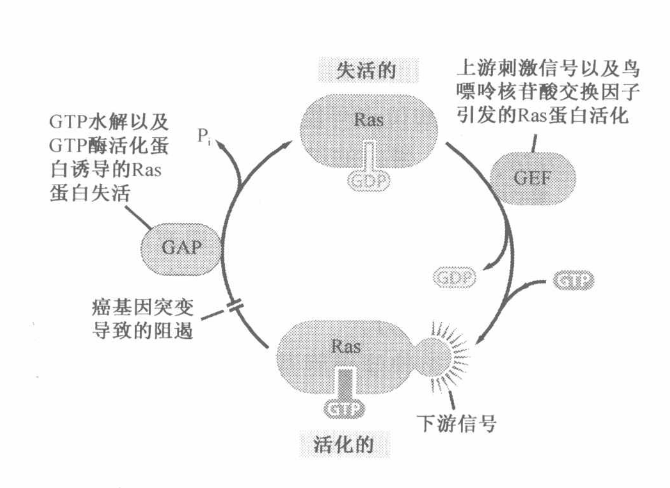


图 5.30　Ras 信号环路　Ras 蛋白生物化学的详尽研究表明，Ras 蛋白就像异源三聚体 G 蛋白一样，是一个二元开关，在非活化状态下结合 GDP（图上部），可以发送信号的活化状态时就结合 GTP（图下部）。因此，非活化结合 GDP 的 Ras 蛋白在被鸟嘌呤核苷酸交换因子（橘黄色）刺激后，释放 GDP，结合 GTP，从而成为活化的 Ras 蛋白。一小段时间后，Ras 蛋白内在的 GTP 酶活性使 GTP 水解为 GDP，信号传递就终止（左侧）。Ras 蛋白的 GTP 酶活性通常被它在活化状态是遇到的 GAP（GTP 酶活化蛋白）所激活。致癌的点突变引起的氨基酸替换可以通过使 RAS 蛋白的 GTP 酶活性失活，从而阻断这个环路，使得 Ras 一直处于活化的信号传递状态。

在人们利用点突变的方法对 Harvey 肉瘤病毒编码的 Ras 癌蛋白进行详细生化分析时，有了一个惊人的发现：和其他正常的 Ras 蛋白一样，Ras 癌蛋白可以结合 GTP，但是，它似乎已经丧失了大部分的 GTP 酶活性（图 5.30）。这种情况下，它可以被上游刺激信号和鸟嘌呤核苷酸交换因子（GEF）激活为有活性的信号传递状态。但是一旦被激活为活性状态，它就不能自动关闭。这说明点突变引起的氨基酸替换破坏了在 Ras 蛋白行使正常功能中十分重要的负反馈调节环。

这一点就为 Ras 蛋白可以作为癌蛋白提供了清晰的解释：Ras 癌蛋白可以给细胞发

送不符合细胞自然生长特性的长时间的几乎无限制的生长信号，取代了正常状态下的短时间精确定量的生长信号。后续研究又在癌细胞中发现了控制 Ras 蛋白的其他水平的异常（信息栏 5.11）。

信息栏 5.11　GTP 酶活化蛋白与癌症　当 Ras 蛋白被纯化出来单独研究时，只有很低水平的 GTP 酶活性。但是，在活细胞中，结合了 GTP 的 Ras 蛋白可以和一类叫做 GTP 酶活化蛋白（GAP）的蛋白质发生相互作用。这种相互作用使 Ras 蛋白的 GTP 酶活性增加了 1000 倍，从而引起 Ras 蛋白由结合 GTP 的活化状态迅速转换成结合 GDP 的非活化状态（Ras-GAP 蛋白，两个已知的 GAP 之一，可以插入 Ras 蛋白 GTP 酶结构域的裂缝中，从而参与到使 GTP 转化为 GDP 的酶催化过程中）。

GTP 结合的活化 Ras 蛋白的周期是由它遇到 GAP 分子需要的时间来控制的。因为 GAP 本身是由其他信号所调控的，这就意味着 Ras 蛋白的 GTP 酶活性是由其他信号通路间接调控的。而且，就如后面所言（7.10 节），如果细胞缺失一种叫做 NF1 的 Ras GAP，就将导致细胞 Ras 蛋白的 GTP 酶活性异常低下，引发结合 GTP 的 Ras 蛋白聚集，使得 Ras 信号通路超活化，最终形成神经外胚层瘤。

这些发现为很多人类肿瘤中都发现 Ras 蛋白的突变提供了合理解释。就如我们所知（4.4 节），点突变形成的癌蛋白属于错义突变（通常只发生一个氨基酸替换）而不属于无义突变（造成生长蛋白质链的提前终止）。而且这些点突变通常造成 *ras* 基因可读框的 12 或者 61 号密码子突变（极少情况下发生在 13 号密码子上）。

我们可能猜想：基因组 DNA 上这些特殊的核苷酸位点可能更易于受到致突变的致癌物攻击并改变。但是，用 X 射线结晶学方法对 Ras 蛋白的结构进行详细的研究却发现了更为令人信服的结果（图 5.31）：Ras 蛋白的 12、13、61 位氨基酸残基都位于 Ras 蛋白行使 GTP 酶活性的区域。于是，这三个氨基酸的任何替换，如早期遭遇的甘氨酸到缬氨酸的替换，都会损坏 Ras 蛋白的 GTP 酶活性。确切地说，这些替换损坏了 GTP 酶活化蛋白（GAP，图 5.30）引发 Ras 水解 GTP 的能力。

了解了这些，我们就可以立刻理解为什么在人类肿瘤细胞基因组仅发现 Ras 蛋白有限数目氨基酸残基的点突变。*ras* 原癌基因的大规模突变，如缺失，在肿瘤中并不常见，因为这些突变通常导致 Ras 蛋白功能缺失而不是增强。相似的，绝大部分引发 *ras* 原癌基因的点突变都产生失去而不是增强发出生长刺激信号的突变的 Ras 蛋白。只有当 Ras 蛋白的信号传递能力完好无损地保留，而其 GTP 酶负反馈调节机制被选择性抑制（通过蛋白质上 3 个位点发生任何一个氨基酸替换）时，Ras 蛋白才能获得促进细胞生长和转化细胞的能力。

只有那些极少数发生突变导致 Ras 蛋白三个氨基酸残基中任何一个（12 号、61 号，或者极少数情况下 13 号）发生替换的细胞，才能获得优于其野生型细胞的生长能力，从而有机会成为癌细胞大军中的先驱。因此，虽然影响 Ras 蛋白任何一个氨基酸残基的点突变都是统计学上可发生的，在肿瘤细胞中却仅可以发现少数可以赋予细胞大量生长优势的突变。如果细胞的点突变只影响 Ras 蛋白其他的氨基酸残基，那么细胞将维持原有的正常形态甚至可能失去生长能力。

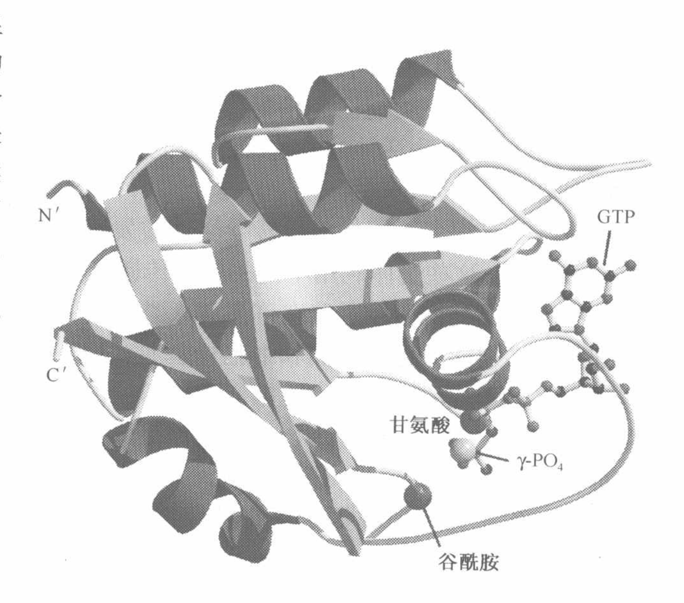


图 5.31　Ras 蛋白的结构　图表显示的是通过 X 射线结晶学检测到的 Ras 蛋白的结构。Ras 蛋白的多肽骨架和 α 螺旋（红色）和 β 折叠（绿色）结构域。GTP 用棍显示，人类肿瘤中 Ras 蛋白经常发生变异的两个氨基酸残基（12 位甘氨酸和 61 位谷氨酰胺）用蓝色球表示。显而易见，这两个氨基酸残基都和 GTP（绿色球）的 γ-磷酸化相关，这就有助于解释为什么这些位点的氨基酸残基替换会影响 Ras 蛋白的 GTP 酶活性，也因此解释了在人类肿瘤细胞基因组中，编码这些氨基酸的密码子为什么更加易于突变。(Courtesy of A. Wittinghofer.)

5.10　总结与展望

早在 19 世纪 80 年代早期，*erbB* 和 *sis* 等癌基因的发现就揭示了生长因子信号通路和细胞转化机制之间的密切关联。更特别的是，这些关联提示细胞转化是由于有丝分裂信号通路的过度活化所引起的。这种观点引发研究者对癌发生的生物化学机制方面的兴趣。很多人开始研究生长因子受体和它们作用的生物化学机理。

围绕生长因子受体的一个主要问题就是它们把信号从细胞外传递到细胞内的机制。很快一个简单的模型就建立起来并用以解释这个问题：生长因子受体的配体结合在它们的胞外功能区，这样就促进受体分子结合形成二聚体。生长因子受体胞外功能区的二聚体化首先发生，然后促进受体胞质区的二聚体化，即可使受体胞内区结构域发送信号。

这个模型并不能在生物化学水平上解释受体是如何传递信号的。对 Src 蛋白的生物化学研究可以提供一些线索。Src 蛋白是一种酪氨酸激酶，这类激酶可以将底物蛋白酪氨酸残基侧链上的基团磷酸化，分析了数个生长因子受体的氨基酸序列后，它们的胞质区结构域被发现和 Src 有着结构和功能上的关联。因此，生长因子受体是通过酪氨酸激酶途径发送生物化学信号的。

于是这个信息被整合到受体二聚体模型中：当生长因子受体和其配体结合引发受体二聚体化时，每个受体单体的酪氨酸激酶就使另一个单体受体胞质区结构域磷酸化。这样受体分子胞质区产生了磷酸化尾巴，以某种未知的方式，允许信号继续传递。下一章的大部分都将集中讨论这些下游信号传递机制。

在许多种人类肿瘤中，细胞内都存在受体信号通路的过度活化。通常，这些受体都是过表达的，引起配体非依赖性的活化。受体各种类型的结构变异也会引起更多潜在的配体非依赖型活化。这些大多是体细胞突变的结果，但也有一些是人类基因组中发生了等位基因突变形成的；这些多和各种先天肿瘤易感综合征相关。

这些酪氨酸激酶生长因子受体（RTK）仅仅呈现了细胞感受外界环境的多种方式之一。例如，肿瘤生长因子-β（TGF-β）受体就和 RTK 极为相似：其蛋白质的胞质区具有结合配体的胞外功能区和信号发送的激酶结构域。但是，TGF-β 受体的激酶是具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的，这种激酶通过其他不同的机制进行信号传递，这些我们后面将会提到。

目前已经有很多不同的信号转导受体被发现，其中包括 Notch、Patch-Smoothened 和 Frizzled 类。这些受体利用不同的信号传递机制向胞内传递信号。就如贯穿我们全书的，这些不同的受体信号通路在许多种人类肿瘤的发病机制中扮演着重要角色。

细胞还必须能够感知它们和细胞外基质（ECM）的接触，ECM 是由分泌型的糖蛋白与蛋白多糖形成的一种把细胞镶嵌在组织中的物质。在这里，另外一种受体——整联蛋白，发挥着至关重要的作用。整联蛋白受体通过结合细胞外基质成分而将刺激细胞增殖和抑制细胞凋亡的信号传递给细胞。

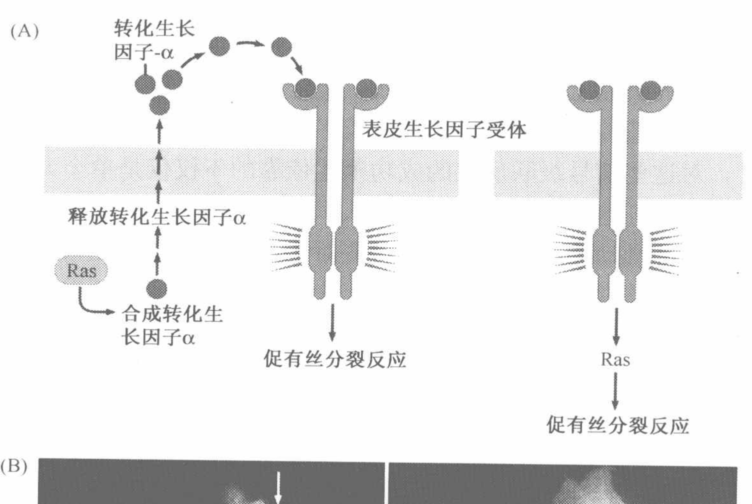
另外一组平行的研究揭示了在肿瘤发病机制中扮演重要角色的 Ras 蛋白的生物化学特性。Ras 蛋白作为一个二元开关，持续地在可发送信号的活性状态和静止状态之间转换。肿瘤细胞中发现其等位基因的突变引起 Ras 蛋白 GTP 酶口袋中发生氨基酸替换，导致蛋白质正常关闭开关机制的丧失。这使得 Ras 蛋白长时间处于可以发送信号的活性状态中，从而使细胞沉浸于无止境的有丝分裂信号洪流之中。

尽管这些研究揭示了信号传递机制中的单独参与者（如 Ras、RTK）是如何发挥功能的，但是却不能解释这些蛋白质之间是如何相互联系的。也就是说，信号转导线路的整合还是一个谜。细胞生理学强烈提示 ErbB（如表皮生长因子受体）和其他酪氨酸激酶受体参与到含有 Ras 蛋白的信号通路中，Src 也参与其中。尽管不同的癌蛋白生物化学功能各有不同，但是它们对细胞却有着相似的作用：都使细胞单层生长，失去接触抑制，获得生长停滞的不依赖性，减低细胞对有丝分裂生长因子的需求。这些功能的相似提示它们可能参与到同一个信号级联反应中。

Ras 和酪氨酸激酶受体的一种可能关联来自于人们发现 Ras 癌基因可以引起细胞生长并释放生长因子这个现象。其中较突出的就是转化生长因子 α（TGF-α），一种表皮生长因子样的生长因子，可以被多种癌基因转化的细胞释放。就如 EGF 一样，TGF-α 结合并激活 EGF 受体（见图 5.16C）。这就提示了有如下可能：一旦 TGF-α 被 Ras 转化的细胞释放，它们就以自分泌的方式激活该细胞表面的 EGF 受体（图 5.12B）；由此引发了类似于突变的持续活化的 EGF 受体产生的一系列反应。由此可见，相对于 Ras 蛋白作为信号级联反应的下游受体，它似乎更多在生长因子受体的上游参与调控（图 5.32A）。

最后，这种自分泌只能解释一小部分 Ras 蛋白的功能，因为 Ras 蛋白也可以转化缺乏生长因子受体的细胞。而且，大量证据表明生长因子受体与配体的结合导致 Ras 的快速活化（图 5.32B）。这就只有一种可能：配体活化的生长因子受体和 Ras 蛋白之间存在胞内直接的信号传递。于是就把研究重点放在揭示酪氨酸激酶受体和类似 Ras 的组成和我们假设的信号转导级联的下游部分的蛋白质之间的生物化学关联上。

用生物化学方法研究这些蛋白质之间的相互关联存在很大的限制。正如我们本章所阐明的，生物化学方法只能是研究者揭示单个分离的胞内蛋白功能的有力工具。但是，



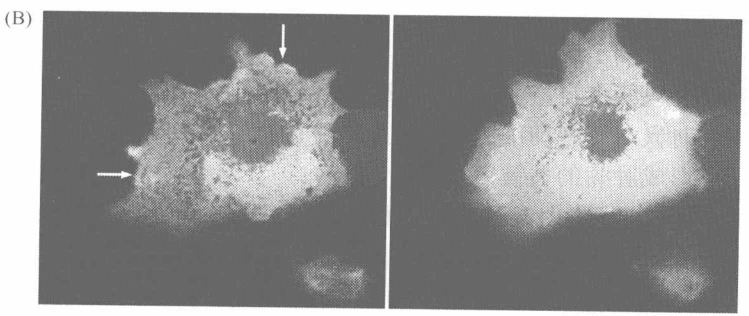


图 5.32　RAS 转化细胞的两种描述　(A) 左侧描述了 Ras（绿色）在正常状态下是如何调控促进细胞增殖的。对 Ras 转化细胞的观察发现，转化细胞释放出许多生长因子，如图中显示的 TGF-b（红圈）。这些生长因子一旦被分泌出来，就以自分泌的方式激活一些受体，如图中显示的 EGF 受体，从而促进细胞增殖。在这种情况下，Ras 位于 EGF 受体的上游。右侧是另外一种描述：这种描述把 Ras 定位于生长因子受体（如 EGF 受体）的下游。(B) 很多证据支持后一种描述。如这张照片显示，给细胞加入 EGF 5min 后，先前靠近细胞表面的非活化的 Ras 蛋白（蓝色阴影）开始被活化（红色阴影）（这个反应发生得如此之快，说明 Ras 蛋白和 EGF 受体之间存在紧密联系）。有趣的是，这种活化只发生在细胞没有接触附近其他细胞的两个边上（白色箭头）。(B，from N. Mochizuki et al.，Nature 411：1065-1068，2001)

它在研究这些不同蛋白质之间是如何相互关联时的作用是有限的。如果细胞真的存在由 A 至 B 至 C 的这种信号传递级联反应，那么生物化学方法只能解释 A 或者 C 是如何单独作用的（如作为激酶或者 GTP 酶），却几乎不能解释蕴藏在它们内部的信号转导通路的整合。

过表达某些生长因子受体的人类肿瘤细胞的详细生物学特性也提示了另一个复杂性。如人乳腺癌，过表达 HER2/NEU 受体（见第 4.3 节）被发现与相关肿瘤细胞的异常表型相关。高表达该蛋白质的细胞表现出更高的 DNA 合成速度，更好的生长停滞不依赖性和更高的肿瘤形成率，当被移植到宿主小鼠体内时（如致瘤性）更易于转移，对雌激素的生长依赖降低。因此，这些受体蛋白格外为肿瘤细胞带来许多特性。对于调控受体活化的简单线性级联反应来说，这些作用似乎是不协调的。其实，有多个独特的下游信号转导通路从这些受体中发散出来，每条通路都引发一个独特的肿瘤细胞表型。同

样的，我们还是无法描绘这些信号通路以及它们的组成。

只有发掘新的实验工具和对复杂信号转导通路的新思路，才能打破这个僵局。遗传学给我们提供了新的研究工具和思路。然而，遗传学方法只能在相对简单的实验生物体上才能操作，尤其是遗传学实验已经发展比较好的果蝇、线虫和酵母这些模式生物。

总而言之，对这些信号级联反应的成功阐述依靠的不仅仅是单个元素。我们从对简单多细胞动物和真核细胞的遗传剖析中已经认识到很多很多。它们的信号转导研究成果是否可以同样用于哺乳动物细胞？起码，这些对于肿瘤生物学家是很有裨益的。因为细胞内信号级联反应是非常线性的，而且千百年来几乎保持不变。所以在果蝇、线虫和酵母中发现的信号通路的组织和设计可以适用于哺乳细胞中。这极大丰富了肿瘤细胞生物学研究领域的认识。

重要概念

- 由于多细胞生物只能在自身个体细胞发展协调的时候才能存活，所以当第一个多细胞动物产生的时候，细胞和细胞之间的交流问题就已经被处理好了。这种细胞信号的调节紊乱是形成肿瘤的关键。
- Src 蛋白被发现是一种蛋白激酶——一种可以使细胞内其他蛋白质发生磷酸化的酶，这也第一次给人们研究癌蛋白的功能机制提供了信息。Src 可以磷酸化多种不同的蛋白质底物，而这些底物又可以分别影响其下游的靶蛋白，这就解释了在 RSV 转化的细胞中，Src 是如何造成多种细胞表型变化的。
- Src 把底物蛋白的酪氨酸磷酸化，而不是像大多数蛋白激酶一样磷酸化底物为丝氨酸或者苏氨酸。后续实验证明酪氨酸磷酸化主要发生在有丝分裂信号通路中。
- 表皮生长因子只有结合于上皮细胞上时，才具有有丝分裂效应。这提示了细胞表面受体的参与，后来从人肿瘤细胞系中被分离出来。
- 一旦表皮生长因子受体 N 端的胞外功能区结合表皮生长因子，信号就会通过胞质膜传递下来激活其胞质 C 端结构域的 Src 样激酶区。这样表皮生长因子受体自身就发生了酪氨酸磷酸化，进而发送细胞增殖信号。
- EGF 受体和 ErbB 癌蛋白紧密相关。ErbB 癌蛋白通过一种制定的模式发送生长刺激信号从而强烈促进细胞增殖。在许多种人类肿瘤细胞中，都存在生长因子受体（通常都是过表达或者结构变异）通路的过度活化。
- PDGF 的 B 链和 Sisman 肉瘤病毒的 Sis 癌蛋白之间的密切关系提示细胞转化的另外一种机制。Sis 癌蛋白使感染该病毒的细胞释放大量 PDGF 样癌蛋白，这些蛋白质可以黏附在细胞的 PDGF 受体上。这样形成了一个自分泌环，通过这种形式细胞可以自己调控自身的有丝分裂。
- 酪氨酸激酶与配体的结合引发其发生二聚化。这使得受体胞质区外侧激酶结构域发生酪氨酸磷酸化。这个磷酸化导致下游信号传递通路的活化。
- 二聚体模型解释了过表达生长因子受体是如何促进肿瘤形成的：由于它们数量很多，这些受体分子在胞质膜周围就频繁冲撞形成二聚体，进而磷酸化，受体被活化，发送有丝分裂信号。

- 能够影响到 3 个 RTK 结构域的多种突变都可以引发受体产生配体非依赖性活化。使受体外功能区截短而保留易于发生二聚体化或寡聚体化结构域的基因融合事件可以产生潜在癌蛋白。在一些肿瘤中还可以发现受体胞质区的氨基酸替换或者缺失。
- 除了 RTK，还存在其他受体类型在肿瘤发病机制中发挥重要作用。参与控制造血细胞生长的受体依赖叫做 Jaks 的单独的和它们胞质区无关的酪氨酸激酶。TGF-β 受体的胞质激酶结构域磷酸化丝氨酸或苏氨酸，而不是酪氨酸。当 Notch 和它的一个配体结合后，受体就会剪切两次，释放一个胞质结构区片段，参与形成一种核复合物，从而激活基因表达。结合配体的 Patched 受体脱离叫做 Smoothened 的膜蛋白，然后诱导一种胞质复合物释放转录因子激活靶基因。Wnt 和 Frizzled 受体的结合可以引发一系列级联反应，从而阻止胞质激酶对数个促进生长的蛋白质的降解。G 蛋白偶联受体可以使 G 蛋白从结合 GDP 的非活性状态转换到结合 GTP 的活化状态，而当 GTP 水解后，G 蛋白又重回非活化状态。
- 整联蛋白是一个异源二聚体跨膜细胞表面受体大家族，它们以 ECM 作为配体。整联蛋白可以将信号从细胞传入或者传出。一旦和配体结合，整联蛋白通过使它们胞质区与细胞骨架成分结合起来，而形成局部黏附。
- 就如 G 蛋白一样，Ras 在静止状态结合 GDP，接收信号后释放 GDP 结合 GTP 而活化，传递信号，然后在 GTP 酶活化蛋白的帮助下，发挥自身 GTP 酶活性水解 GTP 而失活。
- 正常 Ras 蛋白和 Ras 癌蛋白的区别在于一个错义突变，这个突变终止了 Ras 的 GTP 酶活性，从而使 Ras 一旦被活化，就无法自动关闭。

思考问题

1. 为什么正常组织中的自分泌信号是一个内在不稳定力量?
2. 每个生长因子都可以在细胞内引发其自身的非常特异的一套生物学反应。要怎样才能改变一个细胞，使它对一种生长因子（如 EGF）的特异性生物学反应被替代，是否是当细胞暴露在另外一种生长因子（如 PDGF）中之后?
3. 细胞暴露在生长因子中而引发的反应通常是逐渐削弱的（如半小时），在这之后细胞就对其失去反应。根据所学到的生长因子的知识，细胞对生长因子的反应逐渐削弱的机制可能是什么?
4. 生长因子受体结合配体后活化通常是依赖受体的二聚体化的，有什么证据？请列举。
5. 异源二聚体 G 蛋白和低分子质量 G 蛋白（如 Ras）有何异同?
6. 为什么对低级生物的研究（如线虫、酵母和果蝇）对于揭示细胞内级联信号传递是非常有价值的，而对于解释细胞表面受体的研究却没什么作用?
7. 整联蛋白有一套独特的调控方式，细胞内信号预示了整联蛋白结合其胞外配体（如细胞外基质）的亲和力。为什么这种信号在细胞迁移现象中是必要的?

参考读物

Cross M & Dexter TM (1991) Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64, 271–280.

Giancotti FG & Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285, 1028–1032.

Goldfarb M (1996) Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 311–325.

Massagué J (2000) How cells read TGF-β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.

Ostman A & Heldin CH (2001) Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. *Adv. Cancer Res.* 80, 1–38.

Schlapefer DD & Mitra SJ (2004) Multiple contacts link FAK to cell motility and invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 92–101.

Schlessinger J (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110, 669–672.

Schwartz MA & Ginsberg MH (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* 4, E65–E68.

Ullrich A & Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203–212.

Yarden Y & Sliwkowski MX (2001) Untangling the signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.

（徐宁志　王早早　刘　梅　闫　霜）

第6章　胞内信号网络确定癌症的诸多特性

任何活细胞都携带着十亿年来祖先们的实践经历。就可以简明地解释为何存在如此聪明又古老的鸟类了。

Max Delbrück，遗传学家，1996年

癌症是一种细胞增殖失控的疾病。正是由于癌细胞的增殖行为如此异常，我们想象癌症细胞会创建出完全不同的调控自身生长和分化的方式——也就是说，癌细胞的调控网络也许和正常健康的细胞的完全不同。然而，这些想法很大程度上夸大了正常细胞和癌细胞的实际差别。事实上，这两种类型的细胞利用几乎完全相同的调控网络。癌细胞中，调控机制仅发现相对很少的改变。它们只是改变一下已存在的调控系统，而不是破坏其全部机制或重新组装一个新系统。

本章将讲述这个调控机制，即在胞质内操纵并调控细胞增殖的单一处理系统。一个电路板由复杂排列的硬件组成，包括电阻线、电容器、二极管和晶体管。细胞也利用网络，网络由内在联系的各种组分组成，而这些组分，毫无例外都是蛋白质。虽然，单个蛋白以及它的功能都是相对单一的，但是这些蛋白组成的系统却通常非常复杂。

在第5章，我们了解细胞表面的受体广泛地接受信号并把信号引导进入胞质中。在本章，我们将探讨这些绝大部分为生长因子受体发出的信号是如何加工并整合到胞质中的。这些信号经过加工之后大多传递到细胞核中，在那里它们为细胞增殖调控的关键机制提供重要的信号。细胞核中的调控——细胞周期，将在第8章中讨论。

单个细胞可以表达2万甚至更多的不同种蛋白，其中大部分包含在下面将要讲述的细胞质调控网络中。这些调控蛋白在胞质中定位各异并以不同浓度存在。这些蛋白并非浮动在如水般的细胞质中，而是形成如同浓稠的汤汁状。事实上，细胞30%的体积被蛋白质占据，而不是液体溶剂。

这些蛋白必须以特异而且精确的方式来相互交流。因此，一个信号级联中的信号蛋白仅可特异地识别来自上游蛋白的信号并传递至特定的下游蛋白。这样，就可忽略细胞中成千上万的其他蛋白（图6.1）。

这就意味着信号通路网络中的每一个蛋白组分都必须解决两个问题。首要问题即为特异性：它如何才能仅同胞内蛋白中的一小部分进行信号交换，而这些蛋白又是信号网络中它的特定信号伴侣？其次，这个蛋白是如何在黏稠的胞浆和核中迅速甚至是瞬间和它的信号伴侣获得联系？

我们研究这个网络是因为它的设计和运转会对阐述肿瘤的产生机制提供线索。因此，前面几章中讲述的癌蛋白的致癌能力，大部分是通过产生可搅乱正常调控系统的信号来实现的。在某种意义上，癌症的确是一种细胞增殖异常的疾病。但是，当我们更加深入了解癌细胞，我们会在另一个层面上理解到：癌症实际上是一种信号加工异常的

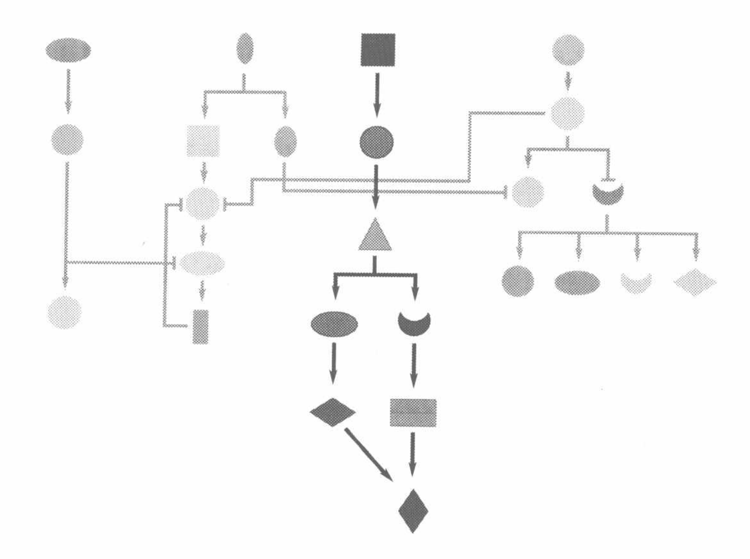


图 6.1　信号级联　该虚构的信号网络图显示了一个信号转导级联——一系列信号蛋白如同分子队列一样运转，从上游信号源（紫色方形）到指定的下游靶点（深绿色菱形），同时避免错误地激活胞内的其他大量信号蛋白（模糊绘制的符号）。

疾病。

本章可能是本书所有章节中最有挑战性的一章。困难来自于信号转导生物化学的绝对复杂性，这一领域存在太多论据，但仅有少数可以统一。因此，关注这些材料难免挂一漏万，完整内容对于一篇章节的阅读来说，实在太多。

6.1　一条从细胞表面至核内的信号通路

暴露于细胞分裂剂的细胞，其生长和分裂明显表现出复杂的调控机制，其中包含着成千上万的胞内蛋白协同作用。那么，生长因子如何简单地通过结合并激活它们的受体即可成功引起这些改变？而这些增殖体系失调如何引起细胞转化？如果它是真的进入，Ras 蛋白又是如何整合进入这一网络？

对于这些问题认识的重要进展来自 1981 年的实验，即利用撤除血清中生长因子而培养正常细胞（尤其是正常成纤维细胞）的实验。在“血清饥饿”期间，培养的细胞都可逆地进入了不生长的静止状态，称之为 G_0 期。在维持于 G_0 期几天后，血清饥饿的细胞又被置于含有新鲜血清中以便获得充足的有丝分裂生长因子。这个实验的目的是将培养的所有细胞同步诱导至一个活跃生长和分裂**同步**的状态。的确，在经过 9～12h，这些原先静止的细胞开始进行 DNA 复制，几小时之后，开始进行分裂。

这些已经观察到的细胞行为变化并没有为细胞内发生的许多不明显但非常重要的分子变化提供线索，通常这些变化发生在暴露于生长因子的几分钟之内。例如，在不到 1h 内，100 多种胞内基因即被诱导转录（图 6.2）。这些我们称为**即刻早期基因**（IEG）的表达，在生长因子刺激不到半个小时内就迅速增加。如图 6.1 所示，其中一些基因的产物通过各种途径帮助细胞从静止的 G_0 期进入活跃的生长分裂期。实际上，有关这些基因的实验显示阻断它们的表达能阻止细胞离开 G_0 期。

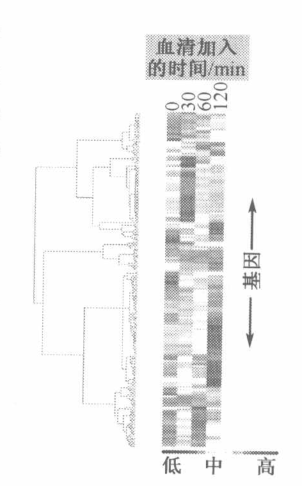


图 6.2 即刻早期基因的表达 处于血清饥饿的细胞暴露于新鲜血清后的 2h 内大量的"即刻早期基因"（IEG）被诱导表达。这种表达甚至发生于蛋白合成被阻断的时期，表明这些基因表达所需要的转录因子已经提前存在于血清饥饿细胞中。这里观测了 14 824 种基因在 30min、60min 和 120min 时的表达情况。分析的表达谱型鉴定出 229 种基因（无标签，从上至下排列）与 IEG 有相似行为。根据不同的基因表达时间，可以归类为 10 种亚类（左侧，分等级的簇状图示）并且每一种都具有特异的诱导时间，并在某些情况下，伴随有后续的抑制作用。红色代表 RNA 高表达，蓝色代表低表达。要知道某些立即早期基因在被抑制之前仅在非常短的时间内表达，即便血清及其相关的有丝分裂原依然存在于培养基中。（From A. Selvaraj and R. Prywes，BioMed Central Mol. Biol. 5：13，2004.）

与 1981 年实验不同的一个实验，是用新鲜血清和**放线菌酮**一起处理细胞，放线菌酮是一种能阻断所有胞内蛋白合成的药物。尽管抑制了蛋白合成，但即刻早期基因的诱导表达依然正常进行。这表明当血清加入细胞的时候，激活即刻早期基因转录所需要的蛋白已经就位了。不同的是，这些基因的诱导不需要蛋白质**从头**（*de hovo*）合成。

这些结果同样证明，除了细胞表面的生长因子受体，胞内还存在另一群蛋白能将促分裂信号从细胞表面迅速传递到核内转录因子。很明显，这些胞内信号转导蛋白的功能性激活并不依赖于浓度的增加（因为放线菌酮对此信号无明显影响）。相应的，酪氨酸激酶受体被其配体激活之后，它们的功能激活表现在蛋白结构、构象的改变以及蛋白的胞内定位。

即刻早期基因编码一些有趣的蛋白（如表 6.1）。其中一些蛋白是转录因子，一旦

表 6.1 一些即刻早期基因[a]

基因名称	基因产物定位	基因产物功能
fos[b]	核	AP-1 转录因子的成分
junB	核	AP-1 转录因子的成分
egr-1	核	转录因子锌指结构
nur77	核	甾类受体相关
srf-1[c]	核	转录因子
myc	核	bHLH 转录因子
β-actin	胞质	细胞骨架
γ-actin	胞质	细胞骨架
tropomyosin	胞质	细胞骨架
fibronectin	胞外	细胞外基质
glucose transporter	质膜	葡萄糖运输
JE	胞外	细胞因子
KC	胞外	细胞因子

a 各种即刻早期基因的总数估计介于 50 和 100 之间。

b 一组 *fos* 相关基因的表达也由即刻早期基因诱导，其中包括 *fosB*、*fra-1* 和 *fra-2*。

c Srf 是结合在其他即刻早期基因启动子区的转录因子，这些即刻早期基因包括 *fos*、*fosB*、*junB*、*egr-1*、*egr-2*、*nur77* 及细胞骨架基因，如肌动蛋白和肌球蛋白。

部分改编自 H. R. Herschman, Annu. Rev. Biochem. 60：381-319，1991；及 B. H. Cochran, inR. Grzanna and R. Brown（编辑），Activation of Immediate Early Genes by Drugs of Abuse. Rockville，MD：National Institutes of Health，1993，3-24.

被合成，就能够诱导下一轮基因的表达，包含 *myc*、*los* 以及 *jun* 等最初与反转录病毒转化一起鉴定的基因。其他即刻早期基因则编码分泌型细胞因子（cytokines），或者编码构建细胞骨架的蛋白。

myc 基因的 mRNA 水平在有丝分裂原加入后迅速增加，撤除后马上下降。另外，Myc 蛋白本身的变化也非常迅速，**半衰期**仅为 25min。这些结果显示 *myc* 水平的表达可以作为胞外局部有丝分裂原含量的指示剂。

另一方面，我们也应该注意到 Myc 作为信号蛋白在很大程度上依赖于它核内蛋白浓度的变化，而和 Ras 和 Src 等胞内信号转导蛋白的作用方式明显不同。这些胞内蛋白在有丝分裂原信号作用下通过共价键和非共价键的变化来改变结构且无浓度上的明显增加。这个差别在正常的 *myc*、*ras* 和 *src* 基因转化为癌基因之后更加明显：Myc 蛋白被下调（构成性表达而不被物理信号调节），而 Ras 和 Src 蛋白是发生构型改变并非含量增加。

在即刻早期基因 mRNA 诱导 1h 之内，第二轮基因诱导开始了。这些**延迟早期基因**的诱导在放线酮的存在下在很大程度上被阻断了，表明它们的表达的确依赖于蛋白的从头合成（如图 6.3）。实际上，这些延迟早期基因的表达似乎依赖于即刻早期基因表达出的转录因子。

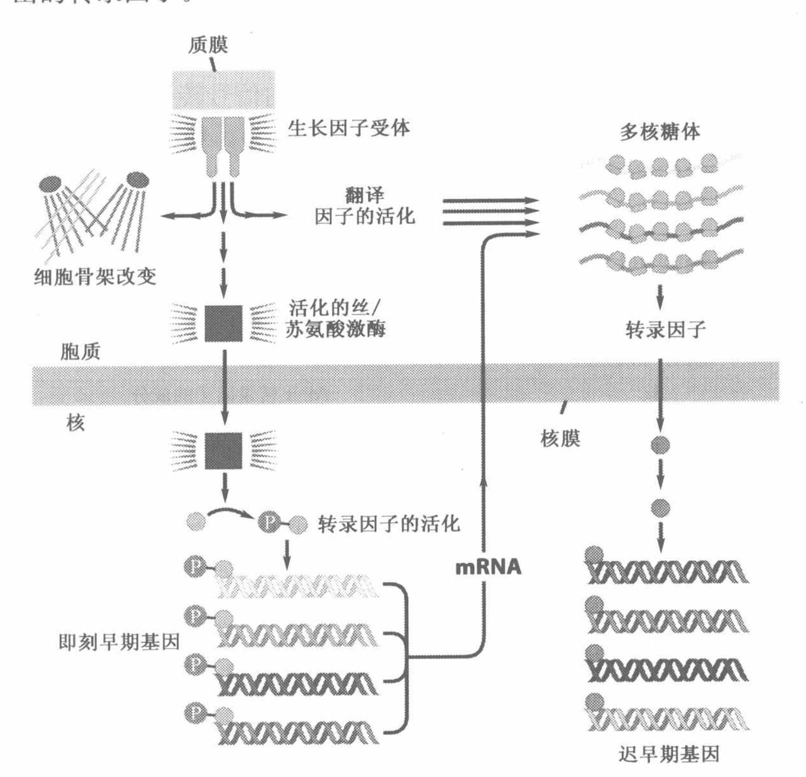
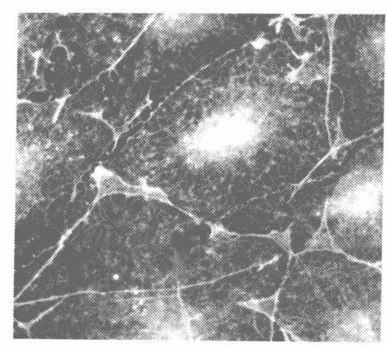
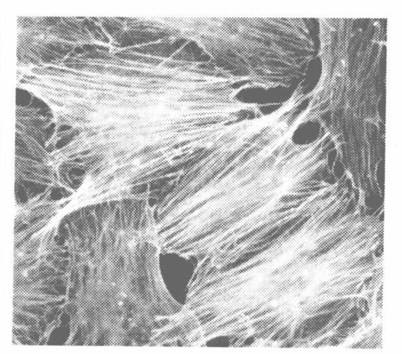


图 6.3 即刻早期与延迟早期基因 血清中促有丝分裂生长因子添加到细胞之后引起的细胞生理上的深刻变化表明当生长因子受体结合了配体后可以释放广泛的生物化学信号。在生长因子刺激的几分钟之内就可以观察到一些即刻早期基因的转录（左下），而延迟早期基因的转录就表现出延迟，因为它需要转录因子的合成（右下）。

给静止细胞添加生长因子除迅速诱导核内基因表达外还能引起细胞生理上其他的变化。暴露于血清后，胞内蛋白的合成速率显著增加，这是通过一些促核糖体起始翻译 mRNA 的蛋白功能活化来实现的。一些生长因子可以诱导细胞具有活动能力，如穿过培养皿的底层所示。其他的可以引起平滑肌肌动蛋白纤维的重组来帮助构建细胞骨架——决定细胞形态的支架（图 6.4）。还有许多生长为细胞存活提供信号，来保护细



无血清



有血清

汇合的3T3细胞

图 6.4 血清诱导下细胞形状的变化 和许多其他细胞类型一样，血清饥饿下的鼠 Swiss 3T3 细胞在血清刺激后在细胞骨架方面发生了深刻的变化。另外，大多由血小板分化的生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）引起的血清刺激，也诱导了细胞活动性的极大增加。(Courtesy of A. Hall.)

胞不被一些消极反应激活如凋亡一类的自杀程序。

这些形形色色的反应表明配体激活生长因子受体后发散出一系列不同的生化信号，并且这些信号作用于胞内的不同靶点。一些信号似乎直接通往核内来调节基因表达，另外一些则明显靶向于胞质，包括蛋白合成系统以及构建细胞骨架结构的蛋白。

了解这些信号级联如何运作明显与癌症问题有关：如果一些癌蛋白真的持续给予细胞有丝分裂信号（见第 5 章），那么癌细胞的这种转化状态就可以很好的代表正常细胞暴露在生长因子环境中的放大版本。事实上，癌细胞的许多特点的确可以追溯为生长因子激活后的反应，但有的就无法通过细胞对这些因子的初始反应来预测（信息栏 6.1）。

信息栏 6.1 在持续生长的细胞中有丝分裂原引起的转录并未引起基因表达 简单的逻辑推理表明，血清饥饿后给予细胞生长因子刺激而马上观察到的转录反应由于是持续暴露于生长因子下，所以可用于预测到有丝分裂原信号持续激活下的转录状态。而在癌细胞里似乎也有这样的信号运作，因为在癌细胞中特定的癌蛋白也能持续地释放有丝分裂信号。相应的，在转化细胞内，生长因子在 1h 内诱导的即刻早期基因和延迟早期基因也应高速率的持续表达。

事实上，在肿瘤细胞中一些即刻早期基因和延迟早期基因成员呈高水平表达，而其他一些则不然。这种不一致性是由负反馈作用使一些基因表达之后立刻关闭造成的。例如 *fos* 基因的表达，它是一种原癌基因，在血清刺激后快速表达并达到峰值，然后在血清刺激后 1h 内迅速下降（见图 6.2）。FOS 蛋白具有这种下调控能力，一旦 FOS 蛋白合成，就成为它自己 mRNA 合成的抑制剂。众多的负反馈机制可以保证细胞在暴露于生长刺激因子后仅瞬时表达。

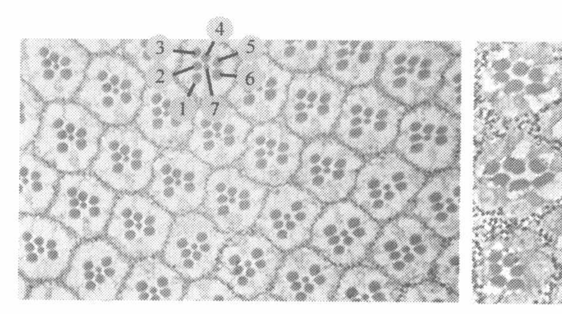
6.2 Ras 蛋白处于复杂信号级联的中心位置

细胞对生长因子的不同反应为那些对胞内信号转导感兴趣的人带来了挑战，因为此前对胞内交互通路的组织及功能几乎一无所知。经过大约 10 年（19 世纪 80 年代），这些通路慢慢像一个拼图游戏迷那样被拼凑在了一起。线索来自许多资料。故事起始于

Ras，并沿着信号通路级联上下延伸直至信号链最终彼此连接上。

在上一章（5.9 节）我们讨论过 Ras 的优点，似乎可以解释它如何作为一个双向开关来发挥作用，但并没有表明它是如何与整个信号网络联系起来的。实际上，Ras 在一条信号通路中发挥的作用仍有可能不依赖于生长因子及其受体。

最终，对 Ras 问题的解决来自于一个完全未预料到的领域。果蝇（*Drosophila melanogaster*）眼部发育的遗传学研究显示，一系列基因的产物对组成果蝇复眼的光感元件——小眼的正常发育起关键作用。其中一个重要的基因称为 *sevenless*，当它缺失时，每个小眼的第七个细胞都无法正常形成（图 6.5）。在克隆和测序该基因后，*sevenless* 基因被发现编码一种具有表皮生长因子受体结构特点的蛋白。



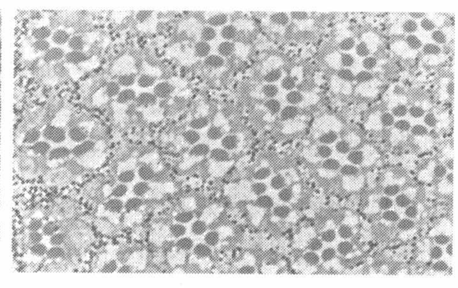


图 6.5　果蝇眼部结构　研究果蝇复眼的光感单位——小眼（左图），表明每一个小眼由 7 个细胞组成，一个在中央其余 6 个围绕周围，如电镜图像所示（上中部数字所示）。一个携带着 *sevenless* 基因突变的果蝇其小眼的第 7 个也就是中间的细胞会缺失（右图）。后来，*sevenless* 基因被发现编码一种表皮生长因子受体（EGF）的同源物。（Courtesy of E. Hafen.）

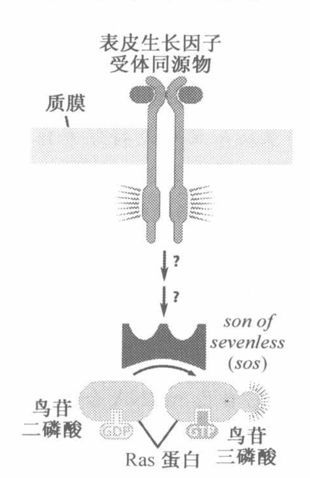


图 6.6　Sos　果蝇眼睛的遗传学研究表明另一种基因的产物存在于信号级联中 *sevenless* 的下游（图 6.5）并且是一种 GDP 交换因子（GEF）（棕色），可以激活 Ras 蛋白。该基因被命名为 *son of sevenless*，简称 *sos*。

其他一些突变则类似于 *sevenless* 突变。遗传互补试验表明这些突变所影响的基因其产物都操纵 *sevenless* 的下游通路，实际上处于在一条线形信号转导级联上。其中一个下游蛋白是由一个名为 *son of sevenless* 简称 *sos* 的基因编码的。密切观察酵母的生化过程，发现 Sos 蛋白与包含在激活核苷酸交换的 G 蛋白如 Ras 有关联。这些酵母蛋白，通常被称为鸟苷酸交换因子（GEF），可以诱导 G 蛋白来释放与其连接的 GDP，以便为 GTP 的结合提供位点。（见图 5.30）。这样便可以将这些 G 蛋白从无活性状态诱导为可以释放信号的有活性状态。而这个精细的反应是 Sos 作用于 Ras 之后的结果（图 6.6）。因此，Sos 就是长期寻找的可以将 Ras 转化为活性状态的上游刺激因子，是调控 Ras 的关键组分。

接着，信号级联的其他中间物也被发现。其中的两个，Shc 和 Grb2 是通过对磷酸化受体或衍生肽有相互作用的蛋白进行遗传和生化扫描而发现的。很明显这些蛋白的功能是作为接头蛋白，在生长因子受体和 Sos 之间

起桥联作用；这些桥联蛋白在后面会做详细讨论。第三个这样的接头蛋白，被称为Crk，是一种由CT10鸟肉瘤病毒编码的癌蛋白。

这个发现证明这条信号通路的最初起源，早在6亿多年前所有现代后生动物门的共同祖先身上已经很完善了。因此，后代机体细胞内的这条级联的主要成分相对仍未发生变化。事实上，这条级联上的每个蛋白组分因为太保守以至于在很多情况下，一个phylum门（如脊索动物门）的蛋白组分可以和另一门（如节肢动物门）的组分互换并重组一条有功能的信号通路。

综上，这些相关而又各异的门的遗传和生化数据可以糅合在一起提示有这样一条线性信号级联：酪氨酸激酶受体→Shc→Grb→Sos→Ras。但这些级联只给出了一条信号通路的框架，并没能从生化交互上说明各种蛋白之间是如何传递信号的。

6.3 酪氨酸的磷酸化控制着许多胞内信号蛋白的定位和活动

在遗留下的未解答的生化问题中，最重要的恐怕就是仍无法理解为何许多生长因子受体具有的激酶作用。这些受体对酪氨酸残基的磷酸化对信号功能有作用么，或者只是一个小插曲？而如果这种磷酸化是重要的，它如何激活复杂的下游信号通路？

有两种机制似乎能够解释。第一种预计在胞质内受体偶联的酪氨酸激酶能够磷酸化一系列靶蛋白。这种共价修饰可以改变蛋白的三维构象（如**立体化学**），即可使每种蛋白处于活化状态以便使信号级联中的信号传递下去。这种模型意味着在所有事件中，受体分子自身的磷酸化是信号转导中第二重要的事情。

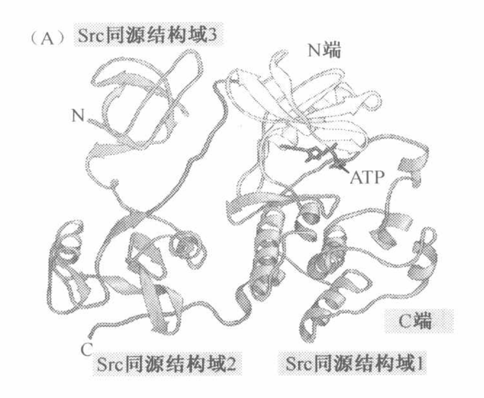
根据另一种模型，生长因子结合后引起的受体胞内区磷酸化可影响它们下游信号分子的定位而不必改变它们固有活性。一旦它们重新定位于胞质内的新位点，这些下游的分子就可以向胞内的其他靶点释放信号。

正如结果所示，第二种模型包含蛋白的重新定位，被证明更为重要。研究Src蛋白的结构给予我们更明确的提示，研究人员发现了三种不同的氨基酸序列结构域，每一种都似乎既存在于Src蛋白中，也存在于其他不相关的蛋白中。这些序列，被称为Src的同源结构域1、2和3（SH1、SH2及SH3），对于解开受体信号通路的谜题起到了关键的作用（图6.7）。

Src蛋白的SH1结构域是它的催化结构域，和Src构型相似的所有受体酪氨酸激酶和非受体酪氨酸激酶中都确实存在相似的结构域。这个共有的序列表明所有这些激酶有共同的进化起源。

19世纪80年代精确的生化分析揭示了Src及其他信号蛋白中SH2结构域的作用。这个约含有200个氨基酸的相对较小的结构域（图6.8）是作为一个内部的“受体”。SH2受体的配体是一个短的多肽序列，它既包含磷酸化的酪氨酸，也包含一个3～6个残基的特异多肽序列。

很快，就发现存在12种不同的SH2结构域，每一种结构域都携带一种不同的蛋白并且该蛋白亲和一种含有磷酸化酪氨酸的特异多肽序列作为它的配体。现在，具有特异序列的SH2系列已被分类。预计人类基因组可以编码至少117种不同的SH2基团，每一种都构成一个较大蛋白的结构域，并且每一种都亲和一种特异的磷酸化酪氨酸及于其



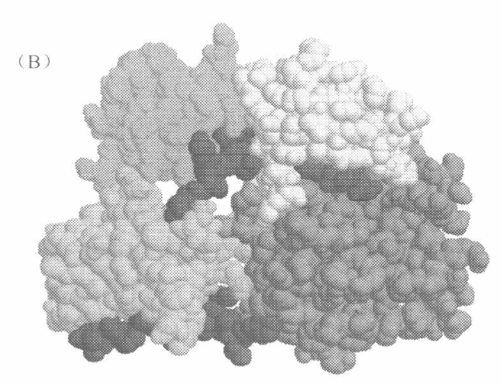


图 6.7 Src 蛋白的结构域 Src 蛋白的 X 射线晶体衍射分析表明存在 3 种不同的结构域，它们同样存在于许多其他蛋白质中。(A) Src 蛋白的详细结构如带状图表所示，其中螺旋结构域表示 α 螺旋，平板带状代表 β 折叠。如同许多其他后来分析的蛋白激酶，SH1 的催化结构似乎包括两部分（下图），标为 N 端和 C 端激酶结构域（黄色和橙色）。ATP 结合位点位于这些端点之间，是催化反应发生的地方（红色棒图）。左侧为 SH2 和 SH3 结构域（蓝色和浅红色）。并且包含在底物识别及催化作用中，连接序列用深红色表示。(B) Src 的空间结构填充图。(A, from B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; B, courtesy of M. J. Eck, see W. Xu et al., Mol. Cell 3: 629-638, 1999.)

相连的多肽序列。

最普遍的情况是，一个 SH2 结构域可以使携带它的蛋白与一个伴侣蛋白结合，这个伴侣蛋白具有特异的磷酸化酪氨酸并可与氨基酸序列相连，就使这两种蛋白复合起来。一些含有 SH2 的蛋白根本不具有催化活性。其他一些这样的蛋白，除了具有 SH2 结构域，携带的催化位点与 Src 蛋白本身的酪氨酸激酶（TK）活性完全不同。例如，磷脂酶 C 的一种形式携带一个 SH2 结构域，作为磷脂酰肌醇（-3）激酶（PI3K）的 P85 亚基。即将要讨论的 SHP1 蛋白，携带的 SH2 结构域与一个**磷酸酶**的催化结构域连接，即具有去磷酸化的活性，与激酶的作用方式相反。

这些发现表明不同蛋白的催化结构域及 SH2 基团作为一个独立的结构模块发挥作用。这些模块在进化上以不同的组合方式连接起来。这些蛋白的 SH2 基团使其能够在细胞中定位于特定位点，尤其是定位于含有特异磷酸化酪氨酸的蛋白，含有 SH2 的蛋白可以根据它们确定定位范围。

SH2 基团的相关发现最终解决了酪氨酸激酶受体如何发出信号的难题。此由图 6.9 所示。配体诱导的转磷酸化作用的结果，是受体分子如表皮生长因子受体，其胞内区获得并产生特征性的磷酸酪氨酸残基；同样，血小板来源生长因子受体在其胞内区也具有特异的磷酸酪氨酸。这些胞内区产生的磷酸酪氨酸残基的特异性使它们可被氨基酸序列所指定并连接在其 C 端的磷酸酪氨酸上。这些磷酸化酪氨酸对各种包含 SH2 的胞内蛋白产生亲和位点，尤其是对胞质内可溶区（**细胞液**）的一些常见蛋白，它们可在胞质内自由定位。于是，在配体结合并激活后不久，一个生长因子受体就通过其各种磷酸酪氨

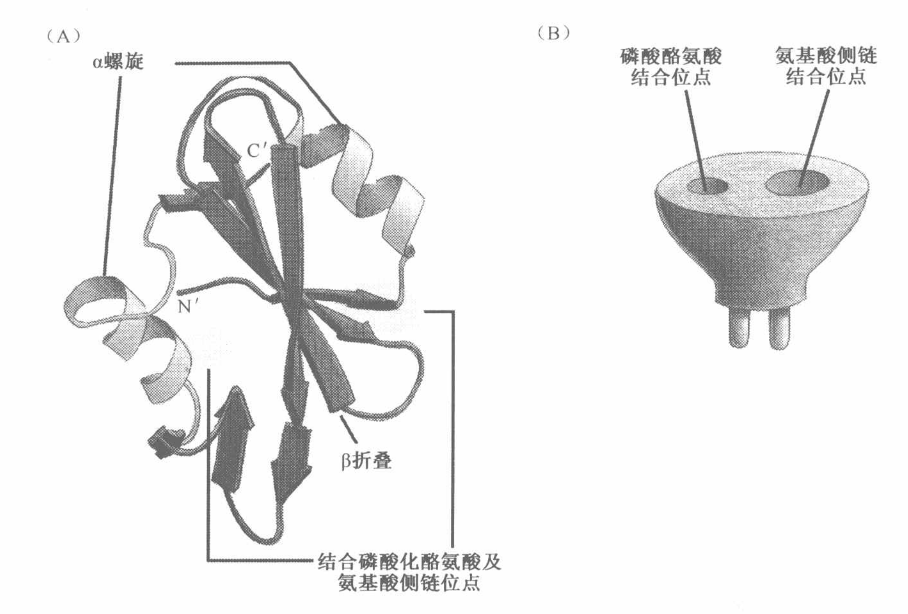


图 6.8　SH2 基团的结构和功能　(A) 该带状图显示一个典型 SH2 结构域晶体衍射所揭露的三维结构。该图显示的 SH2 结构域和图 6.7 中的来自于不同的视角。一个典型的 SH2 结构域包含约 100 种氨基酸残基并由一对 α 螺旋（绿色）包围着的一对反向 β 折叠（红色）组成。SH2 结构域中和它的配体——一个含有磷酸酪氨酸（PY）的肽段相连接的位点用黄色圆点表示。(B) 正如示意图中所描绘的，SH2 结构域起到一个插塞的作用：它既识别磷酸化酪氨酸也在它的 C 端与磷酸化酪氨酸相连接的氨基酸序列相识别。这些相连的氨基酸残基决定了结合的特异性，例如，决定了特异的酪氨酸磷酸化的多肽序列识别并结合在特定的 SH2 结构域上。(A, based on data from G. Waksman et al., Cell 72: 779-790, 1993; B, from B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

酸来募集特异的含有 SH2 的蛋白。

例如，血小板来源生长因子的配体激活形式可以募集 Src、PI3K、Ras-GAP（可激活 Ras 的 GTP 酶活性；见信息栏 5.11)、SHP2（含 SH2 的酪氨酸磷酸酶 2）和 PLC-γ（磷脂酶 C-γ)。这些蛋白的每一种都携带至少一个 SH2 结构域，并且它们都在血小板来源生长因子受体的激酶区（称为“激酶插入”）中间很短的一段酪氨酸磷酸化后结合在血小板来源生长因子受体上。一旦被定位于血小板来源生长因子受体，一些含 SH2 结构域的蛋白就成为 PDGF 受体激酶的酪氨酸磷酸化底物（是否所有这些含 SH2 的蛋白或其他蛋白可以同时结合于单个配体激活的 PDGF 受体分子还不清楚)。

这些相关蛋白的生化多样性至少给我们提供了一个问题的答案，即一个生长因子如何引起一个细胞的各种生化和生物学反应：这些蛋白的每一种都控制自身下游信号级联，而每种级联都影响细胞行为的一个方面。与受体分子结合后，含有 SH2 的蛋白就倾向于激活它们各自的级联。一些含有 SH2 的蛋白可以激活负反馈环最终可关闭受体信号通路（信息栏 6.2)。

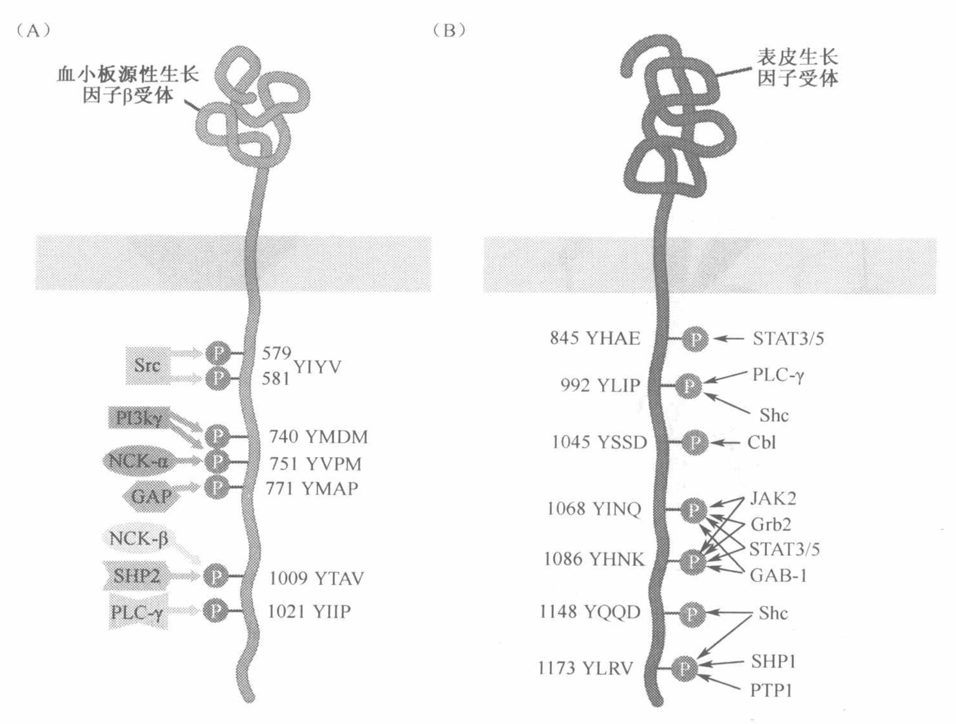


图 6.9 磷酸化的受体募集的信号转导蛋白 (A)血小板衍生的生长因子-β的受体(PDGF-β),省略酪氨酸激酶结构域的分子结构图,显示了在配体结合并激活受体后其C端大量的酪氨酸残基发生了磷酸化(受体多肽链上的酪氨酸残基位置由数字来表示)。左侧是7种完全不同的胞内蛋白,每一种都可以同通过SH2结构域结合PDGF-β受体中一种以上的磷酸酪氨酸。每一种磷酸酪氨酸附近的氨基酸都用单字母表示。正如前面暗示的,C端与每一个酪氨酸残基相连的三个氨基酸残基决定了这7个含有SH2结构域的相关蛋白的唯一性。(B)类似的,在表皮生长因子结合了配体之后也会产生这样的磷酸酪氨酸丛,经常是与HER2受体蛋白形成异源二聚体。然而,和表皮生长因子受体结合的含有SH2的蛋白又大不相同,所以此受体可以激活另一套下游信号通路。(A, adapted from T. Pawson, Adv. Cancer Res. 64: 87-110, 1994; B, adapted from R. Sordella et al., Science 305: 1163-1167, 2004.)

信息栏 6.2 一个含SH2结构域的分子决定着奥林匹克竞赛的结果 酪氨酸激酶受体的一种含SH2的蛋白伴侣是一种磷酸酪氨酸磷酸酶(PTP),一种可以把磷酸基团从磷酸酪氨酸上移去的酶。一旦它通过SH2定位于一个配体激活的酪氨酸磷酸化的受体上,这种特定的磷酸酶称为SHP1,可以移去酪氨酸残基上的磷酸基团使受体无法募集其他下游信号伙伴。在这种情况下,像SHP1这样的酶可以建立一种负反馈环来关闭下一步受体的激活。实际上,SHP1磷酸酶可以关闭许多受体通路,其中有红细胞生成素(EPO)因子的受体,它对红细胞生成素产生应答并启动红细胞生成(在图6.22中将给予描述)。

一些个体携带一种遗传的突变受体基因可编码一种红细胞受体而缺失SHP1磷酸酶的停泊位点。在表达这种突变受体的细胞中,缺失负反馈环的控制导致红细胞生成素因子受体的超活化,因此比正常水平的红细胞水平和携氧能力要高。在一个芬兰家庭中几个携带这种遗传基因缺失的成员,这种缺失对他们赢得奥林匹克金牌起关键的作用(令人惊讶的是,SHP1的表达在许多白血病和非霍奇金淋巴瘤中都关闭;这就使其在肿瘤中多种有丝分裂原受体分子过度激活)。

由于酪氨酸激酶受体的胞内区靠近质膜内侧，由受体募集而来的含 SH2 的蛋白因此也贴近质膜，即也靠近质膜附近的其他蛋白。这种靠近使得各种含 SH2 蛋白可直接同质膜相连的蛋白或磷脂相作用，因此产生了一系列生化信号通过各种信号转导级联传递下去。

例如，Ras-GTP 激活蛋白（Ras-GAP）可被一种磷酸化受体所募集，并与 Ras 靠近。Ras 蛋白的大部分通过 C 端的亲脂端持久锚定在质膜上。这就可使 Ras-GAP 与邻近 Ras 分子相作用，激活它们来水解结合的 GTP，使其从活化状态转化为失活状态。

相似的，当磷脂酰肌醇（-3）激酶定位于质膜附近，它可以接触并磷酸化肌醇脂质。在 6.6 节我们会讨论这种酶及其作用机制。另外一个例子来自磷脂酶 C-γ（PLC-γ），当它通过受体定位于质膜后，可以切割一种膜连接的磷脂（PIP2）成两种产物，每一种都具有潜在传递信号的功能。因此认为在酶被磷酸化受体募集后它与底物的靠近可以产生很多反应。

SH3 结构域，Src 中的第三个序列产生的模体（图 6.7）特异地结合伴侣蛋白中的多脯氨酸序列结构域；这些多脯氨酸序列就作为 SH3 结构域的配体（SH3 基团中的一个小区域似乎能够识别不同结构的配体）。这些 SH3 结构域是一个相对古老的发明（明显起源于 15 亿年前），因为在酵母 *S. cerevisiae* 蛋白中存在至少 28 种不同的 SH3。相反，SH2 结构域似乎在后来才出现，大概在酪氨酸磷酸化被广泛使用时（大约 6 亿年前当后生动物出现时）才出现（图 6.10A）。

在 Src 中 SH3 结构域的特例中，有证据表明这个结构域可以识别并结合特定的携带多脯氨酸结构域的底物，一旦结合到 Src 之后，可被 Src 的激酶磷酸化。其他证据则指出在 Src 自身中含有多嘌呤的结构域，可以与 Src 的 SH3 结构域相连，产生一个分子内的连接。通过分析人类基因组序列，发现了 253 种 SH3 结构域，每一种都是一个较大蛋白的一部分。

SH2 和 SH3 结构域是最先被识别和分类的蛋白结构域系列（图 6.10B）。这些特异的结构与都可以识别并结合伴侣分子上的一个特定序列或结构。这些结构域中的一些识别并结合伴侣蛋白上的磷酸化丝氨酸或者磷酸化苏氨酸，其他一些结合特定膜脂的磷酸形式（表 6.2）。另一种名为 PTB 的结构域，如同 SH2 一样可以识别并结合磷酸酪氨酸残基；在这种情况下，N 端相邻的氨基酸残基就决定了磷酸酪氨酸配体的特异性。

表 6.2　各种蛋白携带的结合结构域[a]

结构域名称	配体	含这种结构域的蛋白举例
SH2	磷酸化酪氨酸	Src(酪氨酸激酶),Grb2(接头蛋白),Shc(支架蛋白),Cbl(泛素化),SHP2(磷酸酶)
PTB	磷酸化酪氨酸	Shc(接头蛋白),IRS-1(胰岛素受体酪氨酸激酶信号接头)×11(神经原蛋白)
SH3 14-3-3	富含脯氨酸的磷酸化丝氨酸	Src(酪氨酸激酶),Crk(接头蛋白),Grb2(接头蛋白),Cdc25(CDK 磷酸酶),Bad(凋亡调控子),Raf(丝/苏氨酸激酶),PKC(蛋白激酶 C 丝/苏氨酸激酶)
Bromo	甲基化赖氨酸	P/CAF(转录协同因子),染色质蛋白
PH[b]	磷酸化的肌醇磷脂	PLC-δ(磷脂酶 C),Akt/PKB(次/苏氨酸激酶),BTκ

a 至少有 32 种结构域已得到鉴定。该表格列出了常与有丝分裂信号转导相关的 6 种结构域。

b 磷酸肌醇结合结构域包括 pH 结构域、Fab1、YOTB、Vac1、EEA1(FYVE)、PX、ENTH 和 FERM 结构域。

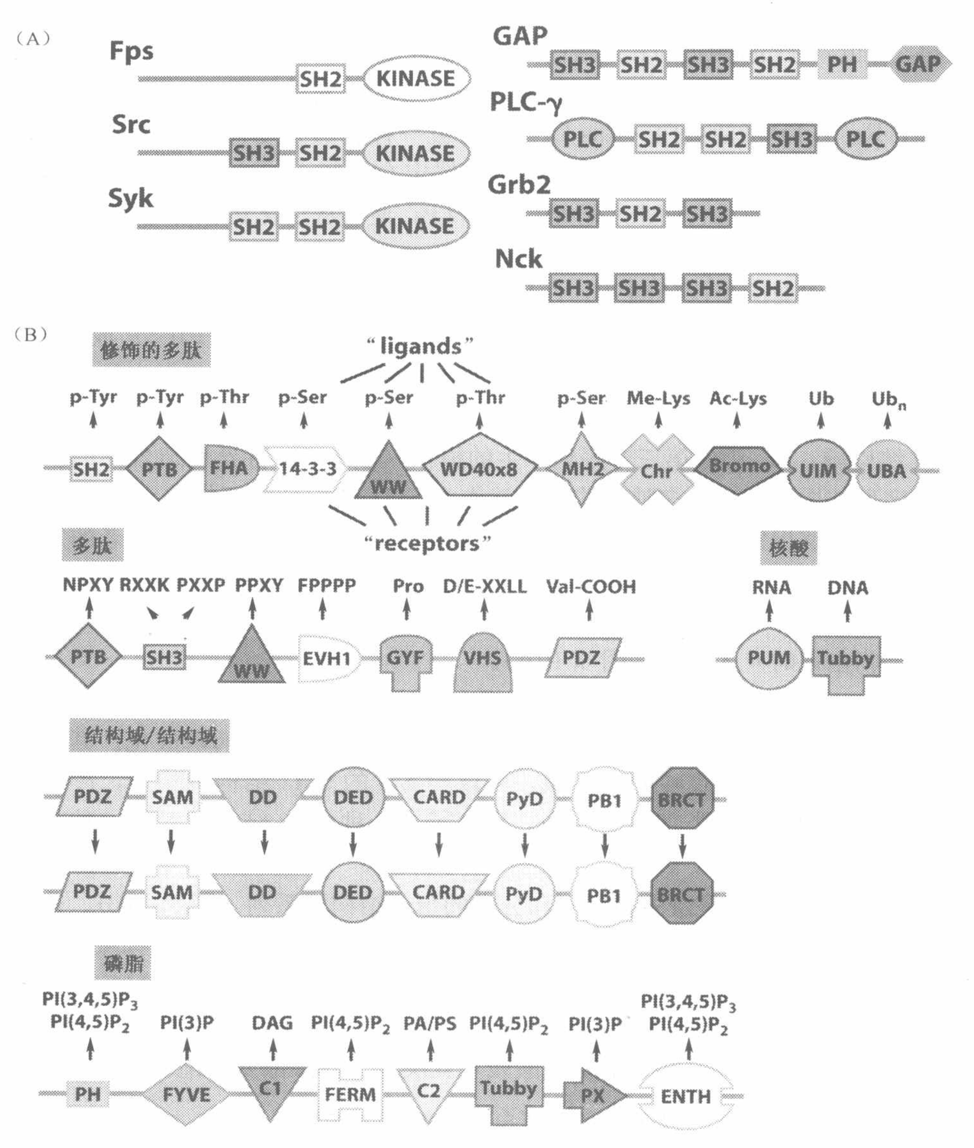


图 6.10 蛋白结构中作为模体单位的蛋白相互作用结构域 SH2、SH3 和 PH 结构域可以组成特异的多蛋白复合体，能分别结合磷酸化酪氨酸、多脯氨酸序列和 PIP3。正如这里所指出的，进化使得这些结构域模块化，使它们与酪氨酸激酶的催化结构域连接，如首先发现的三种酪氨酸激酶（Fps、Src 和 Syk)，与 GAP 结构域连接（GTP 酶激活蛋白）或与 PLC（磷脂酶 C）结构域结合。最下面的两张图显示的是两种只含有 SH2 和 SH3 结构域而没有催化结构域的接头蛋白或者“桥接”蛋白；每一种接头蛋白都作为其他成对蛋白的连接物，其中一个蛋白携带一种特异的磷酸酪氨酸（可结合 SH2 结构域）而另一个携带多脯氨酸结构域（可结合 SH3 结构域）。(B) 分子“配体”通过与“受体”结构域互补结合来促进分子内的相互作用要远远比（A）中显示的多。正如所示，许多修饰过的氨基酸残基、肽段、核苷酸和磷脂都可以作为所示结构域的配体。另外，特定的结构域（“结构域-结构域”）也喜欢形成蛋白分子的同源二聚体。(A，adapted from T. Pawson，Adv. Cancer Res. 64：87-110，1994；B. from T. Pawson and P. Nash，Science 300：445-452，2003.)

综上所述，这些不同的结构域阐明了胞内的交流路线是如何被限定的，信号分子和靶分子之间的结合的高度特异性保证了信号只传递给目的靶蛋白而非胞内的其他蛋白。另外，信号蛋白系列实验表明这些不同的结构域作为模块，通过进化按照不同的方式组装来确保内部分子相互作用的特异性（图 6.10B）。

SH2 基团的发现也解释了 Src，这种原始的癌蛋白，在正常细胞中如何起作用，且 Rous 病毒是如何重新组装 Src 的结构，让其成为一个癌蛋白（信息栏 6.3）。

信息栏 6.3 Src 蛋白的 SH2 结构域有两种功能 我们已经把 SH2 描绘成一种蛋白结构域使得携带它的蛋白能够识别并结合在其他含有磷酸化酪氨酸的伴侣蛋白上，并形成双分子复合物。在如 Src 这样的酪氨酸激酶中，SH2 基团还行使着一种完全不同的功能。如大多数信号分子，Src 激酶通常呈现一种功能沉默的构象。它是通过一个 Src 蛋白中的负调节结构域来维持这种失活状态的——一条多肽链伸长并穿插入 Src 蛋白中的催化位点阻止该激酶的底物结合。这个阻隔的结构域（有时称作“活化环”；见图 5.18）在 Src 的 SH2 基团发挥作用时处于特定位置，可以识别并结合 Src 自身的 527 位磷酸化酪氨酸。因此，SH2 基团就形成了一个分子内桥而非分子间桥（图 6.11A）。一些受体，如 PDGF 受体，能够通过受体结合活化并在其胞内结构域中结合 Src 蛋白上 SH2 基因的结构域而产生磷酸酪氨酸。因此，Src 的可变 SH2 基因打开其分子内的键与 PDGF 受体形成一个分子间键，这使得 Src 定位于 PDGF 受体附近（图 6.11B）。同时，Src 蛋白的催化裂口能够从自身的负调节结构域中解放出来，使 Src 可以开始磷酸化自己的底物，由此协助 PDGF 受体的信号传播（图 6.11C）

从 Rous 肉瘤病毒中分离出来的 Src 癌蛋白是正常 c-Src 蛋白的一种突变形式，在其 C 端寡肽序列结构域原有的 527 位酪氨酸残基被其他不相关的氨基酸序列所替代。因此，在这个位点无法形成磷酸化酪氨酸并且也无法形成分子内抑制环来阻断 Src 的催化位点。病毒的癌蛋白（V-Src）就可以持续活化。一个类似的 Src 突变体，其 C 端的 6 个氨基酸缺失了（包括 527 位的酪氨酸），在人结肠癌的肝转移病例中有报道。然而 Src 激酶在许多结肠癌中都高度活化，这只是 Src 蛋白在人癌症中发生突变和结构改变的一个罕见的例子。

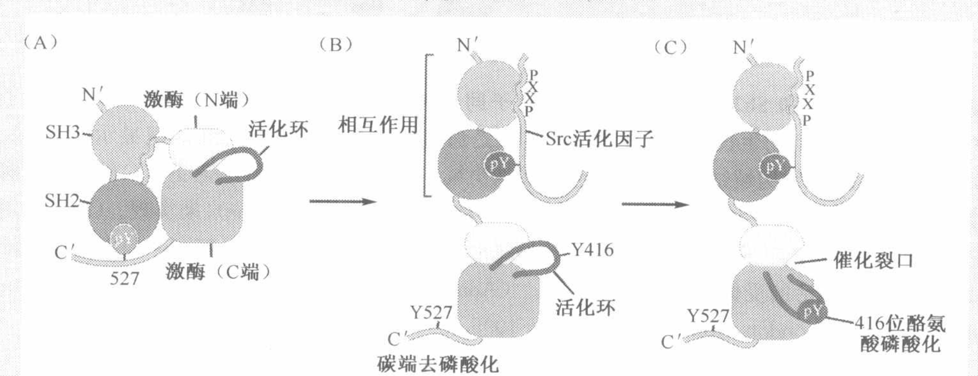


图 6.11 Src 蛋白的结构和功能 （A）Src 蛋白的 SH2 基团（蓝色）通常以分子内形式结合邻近 Src 的 C 端 527 位的磷酸酪氨酸残基（红色）。这个结合使得位于 N 端和 C 端之间激酶结构域的 Src 催化裂口被阻断。同时，SH3（浅绿色）结构域结合激酶结构域 N 端的多脯氨酸段。（B）然而，当 PDGF 受体（这里作为“Src 活化剂”）磷酸化后，它的一个磷酸化酪氨酸（红色）作为 Src 的 SH2 基团的一个配体，使得 SH2 从分子内结合变成了分子间结合。同时，Src 蛋白的 SH3 基团也从分子内结合上分离下来并结合到受体的多脯氨酸结构域上（PXXP）。这些改变可以使 Src 的催化裂口上的构象发生改变并启动它。（C）一个起阻断作用的寡肽活化环（深绿色）终端 416 位上的磷酸化酪氨酸从催化裂口上移开，使得 Src 蛋白恢复完全的酪氨酸激酶活性。（Adapted from W. Xu et al.，Mol. Cell 3：629-638，1999.）

6.4 SH2 基团可解释生长因子受体如何激活 Ras 并获得信号传递特异性

SH2 基团的发现和它们作用机制的阐明对解决一些重要问题提供了可能。生化线索现在可以精确地解释受体-Sos-Ras 级联是如何操作的。

Grb2 蛋白的结构提供了线索。它包含两个 SH3 基团和一个 SH2 基团。它的 SH3 结构域对 Sos 中两种不同的多脯氨酸序列有亲和能力，而它的 SH2 序列则可以和众多配体激活的受体 C 端的磷酸酪氨酸结合。因此，Sos 这个看起来应该在胞质中自由运动的单摆，现在通过 Grb2 这个接头蛋白与受体结合而定位（图 6.12）。

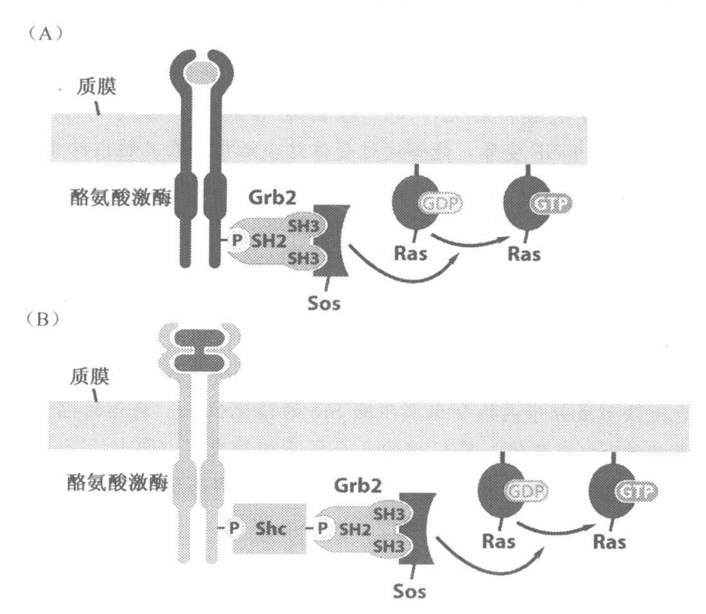


图 6.12 由 Grb2 和 Sh2 桥接蛋白形成的分子间连接 （A）Sos、Ras 鸟核苷酸交换因子（GEF）和配体激活的生长因子受体之间的连接是通过桥接蛋白实现的，如这里显示的 Grb2。Grb2 的两个 SH3 结构域结合 Sos 的多脯氨酸结构域，它的 SH2 结构域结合受体 C 端的一个磷酸化酪氨酸。（B）另一种结合形式可以通过两个桥接蛋白（Grb2 和 Shc）来实现。Grb2 利用它的 SH3 结构域结合 Sos 而它的 SH2 结构域结合 Shc 上的磷酸酪氨酸；而 Shc 利用它自身的 SH2 结合配体激活的受体上的磷酸酪氨酸。（Adapted from G. M. Cooper，Oncogenes，2nd ed. Boston and London：Jones and Bartlett，1995.）

深入分析 Grb2 蛋白的结构和其构象相似的蛋白（如 Crk）表明它们除了 SH2 和 SH3 结构域之外不携带其他的功能结构域。显然，这些接头蛋白的作用就是用来连接不同蛋白的（在图 6.12 中还显示了另一种桥接，当一个生长因子受体和 Sos 连接时可以通过 Grb2 和 Shc）。

当 Sos 通过 Grb2（或通过 Grb2 及 Shc）与受体连接时，它和 Ras 非常靠近，而 Ras 的大部分都永久性的定位于质膜内表面上。Sos 就可以定位并直接与这些 Ras 分子相互作用，诱导它们释放 GDP 并结合 GTP。这种鸟嘌呤核苷酸的转换引起 Ras 蛋白信

号激活。这条生化通路可以显示如下：

受体 → Grb2 → Sos → Ras

或者

受体 → Shc → Grb2 → Sos → Ras

由于众多信号蛋白可被配体活化的受体所募集（见图 6.9），Sos-Ras 通路只代表了生长因子受体发散出的众多信号级联中的一条。

一些受体，如血小板来源生长因子受体，能够通过受体结合活化且其胞内结构能结合 Src 蛋白上的 SH2 结构域产生出磷酸酪氨酸。因此，Src 的可变 SH2 基团打开其分子内共价键再与 PDGF 受体形成一个分子间共价键；这使得 Src 定位于 PDGF 受体附近（图 6.11B)。同时，Src 蛋白的催化裂口能够从自身的负调节结构域中解放出来，使 Src 可以开始磷酸化自己的底物，由此来协助 PDGF 受体的信号传递（图 6.11C)。

从 Rous 肉瘤病毒中分离出的 Src 癌蛋白是正常 c-Src 蛋白的一种突变形式，在其 C 端寡肽序列结构域原有的 527 位酪氨酸残基被其他不相关的氨基酸序列所替代。因此，在这个位点无法形成磷酸化酪氨酸并且也无法形成分子内抑制环来阻断 Src 的催化位点。病毒的癌蛋白（v-Src）就可以持续的活化。一个类似的 Src 突变体，其 C 端的 6 个氨基端缺失了（包括 527 位的酪氨酸），在人结肠癌的肝转移病例中有报道。然而 Src 激酶在许多结肠癌中都高度活化，这只是 Src 蛋白在人癌症中发生突变和结构改变的一个罕见的例子。

6.5 Ras 下游三条重要的信号通路之一由激酶级联组成

一个生长因子所引发的多种细胞反应现在可以通过它的同源受体（如可以特异结合它的受体）激活特异的下游信号通路组合来解释。这种特异的生长因子激活之后，每一条通路都可以诱导产生一个或者另一个生物学改变。另外，在癌细胞中信号可能被放大，这种放大是由自分泌信号环的形成或者一个突变的组成性活化受体引起的生长因子持续刺激而来。

下游通路中的一个分支并没有解释突变的 Ras 癌蛋白（它似乎只是生长因子受体多条下游通路中的一条）如何激活细胞的不同变化。这里，信号转导生物化学再一次提供了关键的提示。我们知道 Ras 蛋白的下游至少有三条主要的信号级联。它们多样的作用能够帮助解释 Ras 癌蛋白如何引起细胞行为所具有的如此多的改变。

这些下游信号通路的布局由酵母遗传学和哺乳动物细胞的生化分析糅合而来。这些发现使我们清楚了当 Ras 结合 GTP，Ras 蛋白上的一个名为**效应环**的结构域，可以和一些作为 Ras 效应器的下游信号伴侣相互作用，如行使 Ras 实际功能的蛋白（图 6.13)。每一种效应器在 Ras 蛋白的效应环为 GTP 结合形式的时候有强亲和力，而当 GDP 结合形式时亲和力差。

第一个被发现的 Ras 效应器是 Raf 激酶。像大多数细胞内的蛋白激酶一样，Raf 磷酸化底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基。远在它与 Ras 结合被发现之前，Raf 激酶就已经在速迅转化的鼠反转录病毒和同源的鸡反转录病毒中被确定为癌蛋白（见表 3.3)。

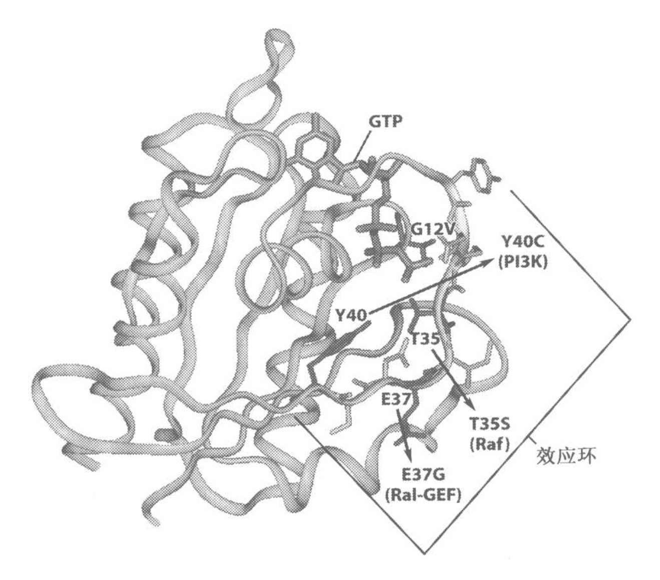


图 6.13 Ras 效应环 Ras 蛋白的晶体衍射结构，与图 5.31 从不同角度观察，再次用带状图表示（绿色）。鸟嘌呤核苷酸（紫色）和相邻的甘氨酸残基一起显示出来，当被缬氨酸替代的时候，导致了 GTPase 的失活（12 位甘氨酸→缬氨酸）。效应环（黄色）至少与 Ras 下游的 3 种效应器相互作用。氨基酸取代（箭头所指）影响效应环中的三种残基形成三种不同形式的 Ras 蛋白，可以和 PI3 激酶，Raf 或者 Ral-GEF 三者之间选择相互作用。（Courtesy of R. Latek and A. Rangarajan，adapted from data in U. Krengel et al.，Cell 62：539-548，1990.）

Ras 对 Raf 的活化反应依赖于 Raf 在胞质内的重新定位。Ras 蛋白一直都锚定于质膜上，通常通过它 C 端的疏水端结合在质膜的内表面。一旦 Ras 结合了 GTP，活化的 Ras 就可以募集并通过其效应环结合 Raf。在这种结合形成之前，Raf 存在于胞质中；结合形成之后，Raf 通过 Ras 定位于质膜附近（或者，在某种情况下，到其他胞内质膜上）。

Raf 和 Ras 结合之后似乎改变了 Raf 激酶分子的三维构象。另外，当 Raf 和 Ras 结合后，Raf 可被某些了解甚少的激酶磷酸化，其中可能包含 Src。Raf 获得了活性并磷酸化激活第二个激酶 MEK（MAPKKK）。MEK 实际上是一种"双特异性激酶"，既可以磷酸化丝氨酸/苏氨酸残基也可以磷酸化酪氨酸残基。MEK 利用这两种功能来磷酸化另外两种激酶，胞外信号调控激酶 1 和 2，通常指的是 Erk1 和 Erk2。一旦被活化，每一种激酶都可以磷酸化底物，然后调节各种胞内进程包括转录。

这种激酶信号级联通常名为 MAPK 通路（丝裂原激活蛋白激酶）。实际上，在哺乳动物细胞中存在一系列这样的信号级联。Erk1 和 Erk2 在 Raf 起始的级联中被称为 MAPK。磷酸化 MAPK 的激酶通常称为 MAPKK；在此研究的级联，MEK 行使这个角色。磷酸化 MAPKK 的激酶则通常称为 MAPKKK（图 6.14）。在这种情况下，Raf 被归类为 MAPKKK。

在这些信号级联中我们了解到，激酶 B 被激酶 A 的磷酸化通常引起激酶 B 的功能激活。例如，当 MEK 被 Raf 激活后，MEK 就作为一种可以传递信号的激酶被活化了。这种丝/苏氨酸的磷酸化与生长因子受体胞内区的酪氨酸残基磷酸化的结果不同。这些受体的磷酸化可以募集信号伴侣并且将伴侣蛋白重新定位；相反，Raf 引起的 MEK 磷酸化可以引起其结构的改变导致其激酶功能的激活。

Ras → Raf → MEK → Erk 通路只是 GTP 结合的 Ras 蛋白活化的下游信号级联之一。在细胞转化中这条激酶级联的重要性，是通过一些细胞类型中的 Raf 蛋白激酶，当其呈现突变的原癌形式，就可以呈现出 Ras 癌蛋白诱导的大部分转化表型。因此，在这些细胞中，Raf 通路就与 Ras 癌蛋白的转化能力密切相关。

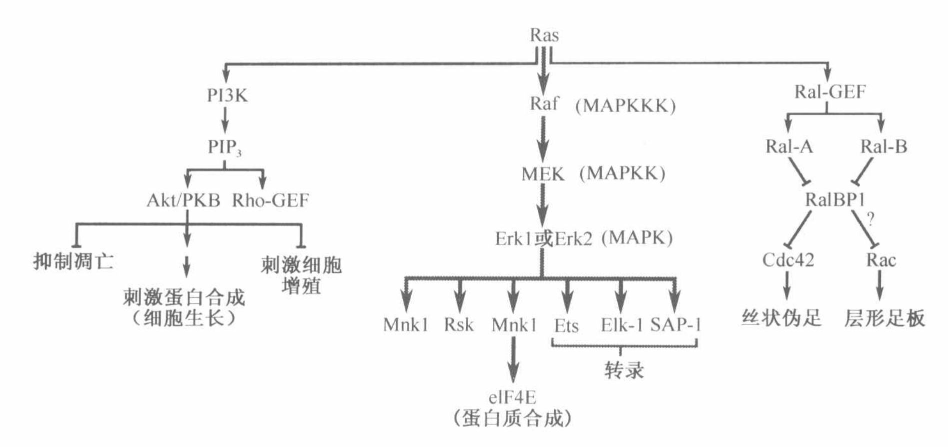


图 6.14 Ras → Raf → MAP 激酶通路 这条信号级联是哺乳动物细胞中 MAPKKK→MAPKK → MAPK 一系列类似信号通路的一种（黑色）。在这种情况下，Ras 活化了 Raf 激酶（作为一个 MAPKKK），后者磷酸化并活化 MEK（MAPKK），就可以磷酸化胞质内的激酶来调节翻译和核内的转录因子。

位于这条级联底部的 Erk 激酶一旦被激活就可以磷酸化胞内的底物并可以转位至核内，在核里可以引起转录因子的磷酸化；其中的一些转录因子可以引起立即早期和延迟早期基因的起始表达。例如，图 6.14 中所示，Erk 可以直接磷酸化一些转录因子（Ets、Elk-1 和 SAP-1），另外也可以磷酸化并激活一些激酶，来磷酸化并激活其他转录因子。同时，这些下游激酶磷酸化两个染色质相关蛋白（HMG-14 和组蛋白 H3）使之构象发生改变；这些特定的修饰使得染色质处于一种易于转录的构型。Mnk1 激酶是 Erk1 和 Erk2 的一种胞内底物，其通过磷酸化作用活化翻译起始因子 eIF4E，从而对胞内蛋白合成机制的活化起到一种协助作用。

当 Erk 磷酸化 Ets 转录因子后，后者可以激活重要的生长调控基因的表达，如那些特异的肝磷脂结合表皮生长因子（HB-EGF）、cyclinD1、Fos 和 p21（这后三种基因的功能在第 8 章将详细描述）。

Raf → MEK → Erk 通路诱导激活的基因之中，编码 FOS 和 Jun 这两种转录因子的早期基因的激活尤为重要。一旦被合成，这两种蛋白相互结合形成AP-1，一种在肿瘤细胞中广泛存在的高度活化异源二聚体转录因子。人们对 Fos 和 Jun 的特殊重要性的认识，源于它们最初都是作为反转录病毒相关癌基因的产物而被发现的（表 3.3）。

Ras → Raf → MEK → Erk 级联对于 Ras 癌蛋白引起的某些癌细胞表型起重要贡献。另外如上所述，除了活化一些生长促进基因外，这条通路还使细胞不再锚定，并失去了接触抑制。同样，它也在 Ras 蛋白所引起的细胞形态的深刻改变起着重要作用。

在某些肿瘤中，Raf 下游的信号通路在没有 Ras 的情况下强烈活化。因此，在 60%～70%的黑色素瘤中，Raf 的一个称为 B-Raf 的功能相近的同源物，被发现呈组成性活化的突变形式。为什么这些黑色素瘤中发生 B-Raf 突变而不是 Ras 突变来驱动增殖还不清楚。

6.6 Ras 下游的第二条通路：调控肌醇脂类和 Akt/PKB 激酶

Ras 蛋白另一个重要的下游效应物能促使 Ras 引发其他细胞反应（图 6.15）。这包括癌症中最重要的细胞学变化，即对细胞凋亡（细胞自杀性死亡）程序的抑制。这种抗凋亡的活性对于癌细胞极其关键，因为大多数癌细胞都是处于极可能激活细胞凋亡的状态。第 9 章将详细讨论这些内容。

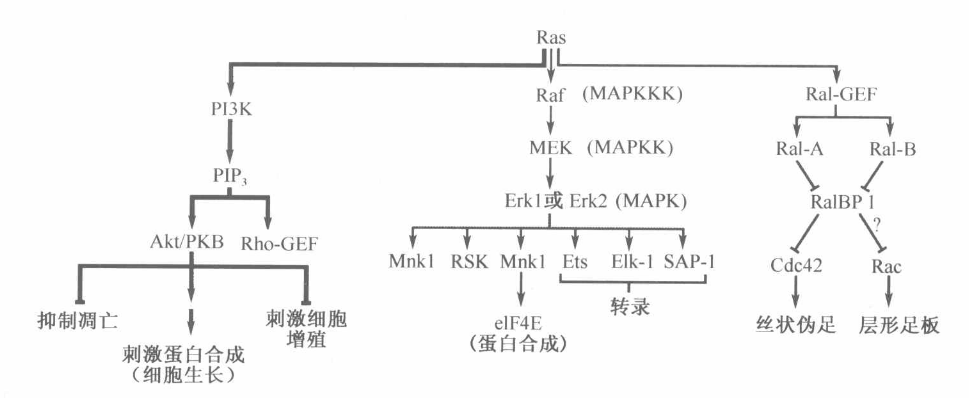
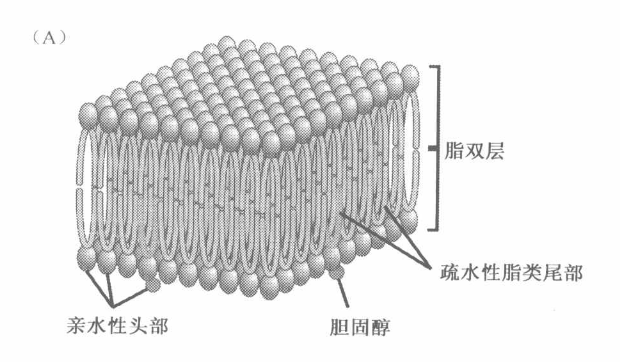


图 6.15 PI3K 通路 Ras 的第二条效应通路（蓝色）源于其结合并激活磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K），生成磷脂酰肌醇-(3，4，5) 三磷酸（PIP3）。这又导致含 PH 结构域的分子，如 Akt（又称作 PKB）和 Rho 鸟苷酸交换蛋白（Rho-GEF）结合到细胞膜上去。Akt/PKB 能失活 Bad（抑制凋亡），失活 GSK-3β——生长促进蛋白如 cyclin D1 和 Myc 表达的拮抗物，以及激活 mTOR（刺激蛋白合成和细胞生长）。

早期的生化研究提示细胞膜的磷脂结构可能只是为细胞内外的水环境提供屏障。这些磷脂都是**双亲性**的，即具有一个亲水性的头部和一疏水性的尾部（图 6.16A）。这种极性很好地解释了脂双层如细胞膜的结构，胞膜亲水基团朝向胞外和胞内的水环境，而疏水性基团则浸埋在斥水的膜中间。

1970 年，研究已表明真核细胞中，一些膜相关磷脂具有与维持膜结构完全无关的功能。一些磷脂在亲水性头部含有肌醇基团，肌醇是一种水溶性碳水化合物分子（更准确地说是一种多元醇），这种磷脂的肌醇部分能被磷酸基团修饰，形成的磷酸肌醇接着与磷脂分子的疏水基团部分相分离。由于其是完全亲水的，这种叫 IP3 的磷酸肌醇能扩散到膜的远处，从而实现其作为一种胞内激素，把信号从胞膜传递到细胞远端的作用（图 6.16A）。这种胞内激素通常称为**第二信使**。DAG（图 6.16B）是这种分离作用的另一产物，其能激活细胞中一种重要的信号激酶——丝氨酸/苏氨酸激酶，即蛋白激酶 C（PKC）。另一方面，磷酸化的肌醇也能与磷脂的残基保持连接，嵌入胞膜，从而作为一个胞内蛋白的锚定位点。

目前已知肌醇部分能被几种不同的激酶修饰，而且每种酶都特异性地修饰肌醇的某一羟基，如磷脂酰肌醇-3 激酶（PI3K）能给嵌在胞膜的磷脂酰肌醇（PI）肌醇部分的 3′羟基加上一个磷酸基团。在已发现的几种 PI3 激酶中，最重要的可能是磷酸化 PI (4′，5′) P2（又叫 PIP2）的 PI3K。PIP2 自身在肌醇部分的 4′和 5′含有磷酸基，经



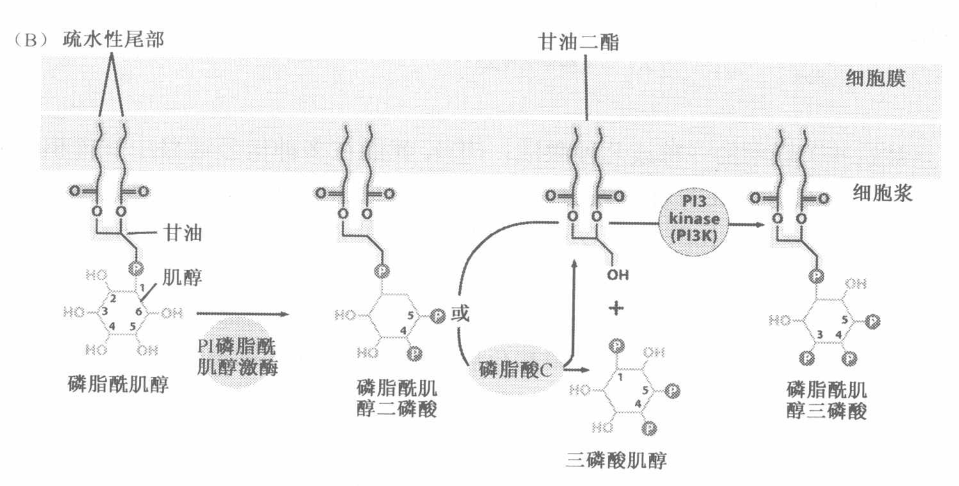


图 6.16 脂双层的生化结构 (A)所有的细胞膜都是由脂双层组成的，脂双层亲水性的头部基团（灰色椭圆）凸出到膜内外的水溶性环境，而疏水性的尾部基团（绿色，灰色）则埋藏在脂双层非水溶性的空间里；有一小部分的头部基团含有肌糖（蓝色）。(B)磷脂酰肌醇(PI)（左）由 3 部分组成：2 个插入到细胞膜中含长烃基尾部的脂肪酸（绿色）、甘油（灰色）和通过磷酸二酯键连接到甘油上的肌醇（浅蓝色）。PI 激酶能给肌醇的各个羟基加上磷酸基团，生成如图所示的 PIP2 等产物。PIP2 被磷脂酶 C 切割，生成能激活蛋白酶 C（PKC）的甘油二酯（DAG）和诱导钙离子从胞内钙库释放的三磷酸肌醇（IP3）。而 PIP2 也能被 PI3K 进一步磷酸化，生成磷脂酰肌醇（PIP3）。PIP3 形成后，其磷酸化的头部基团吸引含 PH 结构域的蛋白，使之能结合到细胞膜的内表面上。

PI3K 修饰后肌醇获得了第三个磷酸基团，因此 PIP2 变成了磷脂酰肌醇（3′，4′，5′）-三磷酸（PIP3，图 6.16B）。

注意这条信号通路的组成与我们前面一节提到的 Ras → Raf → MEK → Erk 级联通路有着显著的不同。在这条通路中，一个重要的激酶（PI3K）是将磷酸基团加到磷脂而不是蛋白底物上。

在这章的早些时候我们简略地碰到过 PI3K（参阅 6.3 节）。那里我们描述这种酶能通过其调节亚基的 SH2 基团吸引一些配体激活的受体，并磷酸化位于细胞膜上的含肌醇磷脂。研究发现 GTP 激活的 Ras 也能结合 PI3K，增强其功能活性（图 6.17）。因此，PI3K 是 Ras 下游的一个直接效应物。如同 Raf 与 Ras 的结合，PI3K 与 Ras 的结合使 PI3K 与膜紧密关联在一起，从而靠近其定位与膜上的底物 PI。

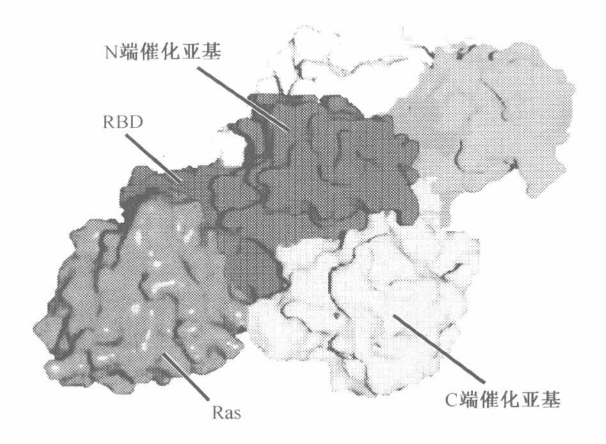


图 6.17 Ras 对 PI3K 的激活作用 Ras（橙色）通过其结构域与 PI3K 的 Ras 结合结构域（RBD，紫色）紧密结合，促使 Ras 参与 PI3K 激酶催化结构域（红，黄）的激活；PI3K 激活后，磷酸化 PIP2，生成 PIP3。PI3K 的其他形式均假设为具有与在此描述的 PI3K 很相似的结构。(From M. E. Pacold et al., Cell 103：931-943，2000.)

一旦被这些关联中的一种或几种激活，PI3K 就能在多种信号通路中发挥枢纽的作用（如图 5.7）。最好的证明就是该酶能被多种信号分子激活，如 PDGE、神经生长因子（NGF）、胰岛素样生长因子（IGF-1），白细胞介素-3 和通过整联蛋白连接的细胞外基质（ECM）(见 6.9 节)。

磷脂酰肌醇的肌醇头部被磷酸化后，对细胞膜结构和功能都几乎没有任何的影响(肌醇磷脂是细胞膜的次要成分)。但磷酸化后的磷脂酰肌醇头部突出胞膜，因而容易被一些胞质蛋白识别和结合。这些蛋白通过磷酸肌醇锚定在膜上后，便能释放出特定的信号。我们下面将详细讨论。

PIP3 在 3′、4′和 5′都带有一个磷酸，是肌醇头部被磷酸化后最重要的产物之一（图 6.16B)。许多与 PIP3 结合的胞质蛋白通常带有 PH 结构域（表 6.2），这种结构域对三磷酸化的肌醇头部基团具有很强的亲和力（图 6.18)。Akt 又称为蛋白激酶 B（PKB)，是一种含有 PH 结构域的丝氨酸/苏氨酸激酶，其或许是最重要的含 PH 结构域的蛋白

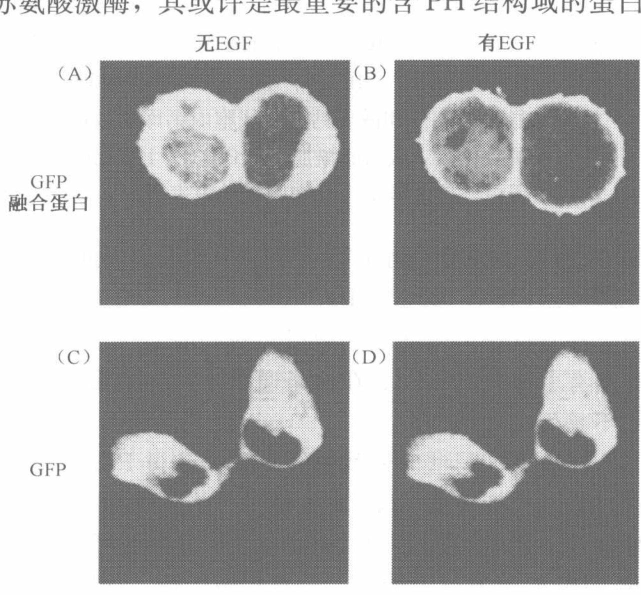


图 6.18 含 PH 结构域的蛋白向细胞膜上的 PIP3 迁移 PIP3 头部基团通过 PI3K 形成后（图 6.16B)，成为含有 PH 结构域蛋白的锚定位点。这一磷酸化和定位的过程在 PI3K 激活后迅速发生，如这张显微照片所示，发荧光的蛋白（绿色荧光蛋白，GFP）与一个含 PH 结构域的蛋白融合表达，这一融合蛋白从细胞远处胞浆迁移（A）到细胞膜内表面（B）加入 FGF（一种表皮生长因子）后。但是，当融合蛋白的 PH 结构域失活时（C)，加入 FGF 不能改变其细胞内分布（D)。(From K. Venkateswarlu et al., J. Cell Sci. 112：1957-1965，1999.)

之一（Akt/PKB 是另外一种反转录病毒相关癌基因的编码产物而被发现的蛋白）。因此，当 PI3K 生成 PIP3 时，Akt/PKB 激酶分子便通过其 PH 结构域结合到 PIP3 从胞膜突出到胞质的肌醇头部上去（图 6.19）。

Akt/PKB 与细胞膜的关联（以及紧接着的 Akt/PKB 磷酸化）导致其激酶活性的激活。磷酸化激活后，Akt/PKB 对一系列的底物进行磷酸化，从而对细胞产生各种各

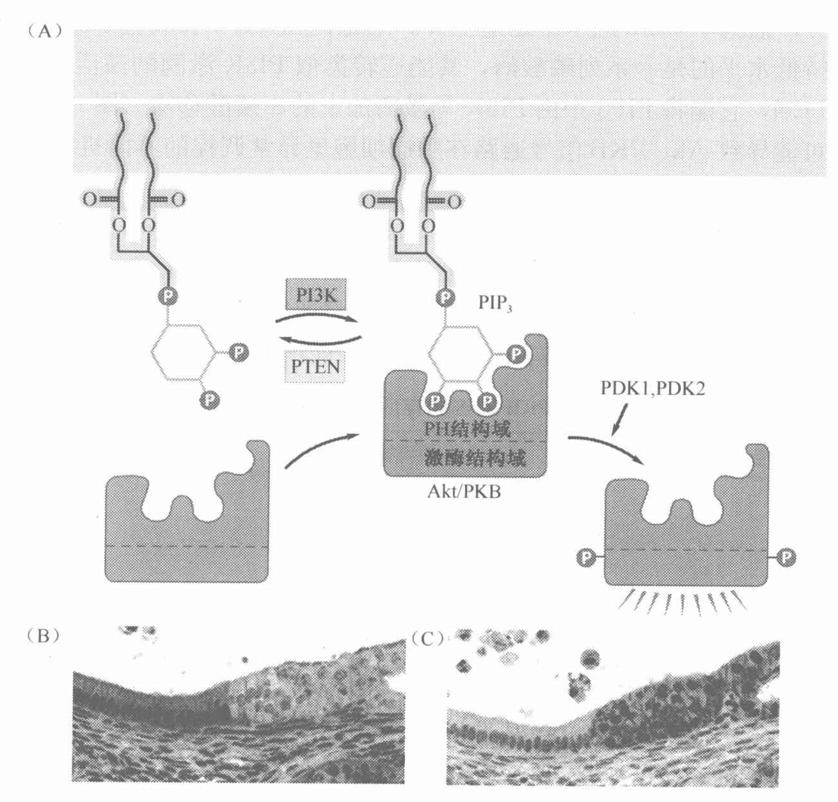


图 6.19　PH 结构域锚定到 PIP3 上　（A）PI3K 形成的 PIP3（见图 6.16B）生成一个细胞内含 PH（血小板同源物）结构域蛋白的锚定位点。锚定的蛋白中最重要的有 Akt/PKB 激酶（棕色）。一旦通过其 PH 结构域锚定在细胞膜内表面，Akt/PKB 就分别被其他两种激酶（PDK1、PDK2）磷酸化而激活（右下）。（最近证据阐明之前未知的 PDK2 是 mTOR，这一蛋白将在第 16 章讨论到。）Akt/PKB 然后磷酸化各种调控增殖、细胞存活和细胞大小的底物。但当 PTEN 也存在并具有活性时，它能使 PIP3 去磷酸化，使其转变为 PIP2，因此使 Akt/PKB 缺乏在细胞膜上的锚定位点。（B）这一反应的动力学可在 $Pten^{+/-}$ 基因型的基因工程小鼠中观察到。这些小鼠的子宫上皮细胞经常丢失另外一个剩余的野生型等位基因，形成 $Pten^{-/-}$ 的细胞，这些细胞往往生成局部异常增生和囊肿。当用抗 PTEN 的血清免疫染色时，这些右边的上皮细胞已经没有 PTEN 表达，并且体积变大，显示了 PIP3 通路在细胞大小方面的调控作用。（C）当用抗磷酸化的 Akt/PKB 抗体去染同一损伤部位时，右边的细胞显示高活性的磷酸化 Akt，而左边的则活性很低。（B and C，from K. Podsypanina et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：10320-10325，2001.）

样的效应。Akt/PKB 对细胞主要有三方面的生物学效应：①减小细胞启动凋亡程序自杀的可能性，促进细胞的存活；②刺激细胞增殖；③刺激细胞生长，即狭义上的细胞体积大小的增长（图 6.19B）。同时，它也能以一种目前尚不了解的机制影响细胞迁移。

PI3K 和紧接的 Akt/PKB 的激活是受到严密调控的。在缺乏生长因子刺激、停止生长处于静息状态的细胞中，胞内的 PIP3 的水平是很低的。而一旦这种细胞遇到分裂素（mitogen），细胞中 PIP3 的水平迅速上升。细胞内使 PIP3 和其他磷酸化 PI 分子通常情况下维持低水平的是一系列磷酸酶，其能逆转类似 PI3K 激酶的激活效应。最有代表性的是 PTEN，它能将 PIP3 中由 PI3K 等激酶加上的 3′磷酸移除（图 6.19）。这种移除提示两种可能导致 Akt/PKB 信号通路在肿瘤细胞里异常调控的不同机制：PI3K 的过度激活或者 PTEN 的失活。

Akt/PKB 丰富的生物学功能必然要求其能磷酸化各类涉及不同信号通路的底物（表 6.3）。其中首要的一种功能——促进细胞的存活，依赖于 Akt/PKB 对任何可能激活细胞凋亡程序的信号的抑制。关于细胞凋亡我们将留待第 9 章中详细讨论。总之，我们只需记住：Akt/PKB 的磷酸化作用可以导致一些促细胞凋亡的蛋白受到抑制。

表 6.3　Akt/PKB 对细胞存活、增殖和生长的作用

生物学功能	Akt/PKB 的底物	功能
抗凋亡	Bad(促凋亡)[a]	抑制
	Caspase-9(促凋亡)[b]	抑制
	IκBkinase(抗凋亡)[c]	活化
	FOXO1TF(促凋亡)[d]	抑制
	Mdm2(抗凋亡)[e]	活化
增殖相关		
	Gsk-3β(抑制增殖)[f]	抑制
	FOXO4(抑制增殖)[g]	抑制
	$p21^{Cip1}$(抑制增殖)[h]	抑制
生长		
	Tsc2(抑制生长)[i]	抑制

a Bad 是 Bcl-X 的拮抗物；两者均是 Bcl-2 蛋白家族成员，控制线粒体膜孔的开合(9.13 节)。

b Caspase-9 是影响凋亡程序的蛋白酶级联的一种成分(9.13 节)。

c IκB 激酶，即通常的 IKK，能被 Akt/PKB 磷酸化和激活(6.12 节)。

d forkhead (FOXO1，以前称为 FKHR)转录因子的磷酸化阻止其向核内的转运，从而阻止了促凋亡基因的激活。

e Mdm2 被 Akt/PKB 磷酸化后激活，诱导 p53 的降解 (9.7 节)。

f Akt/PKB 磷酸化 GSK-3β，使之失活，不能磷酸化 cyclinD1(8.5 节)，并导致其降解。

g FOXO4 (前称是 AFX) 诱导 CDK 抑制剂 $p27^{Kip1}$(8.4 节)基因和一些促凋亡基因的表达；一旦被 Akt/PKB 磷酸化，FOXO4 被运送出核。

h $p21^{Cip1}$是一种类似 $p27^{Kip1}$(8.4 节)的 CDK 抑制剂。Akt/PKB 的磷酸化导致其出核。在胞浆中，磷酸化的 $p21^{Cip1}$被报道能作为 caspase 抑制剂，因而具有抗凋亡的功能(9.13 节)。

i Tsc2 被 Akt/PKB 磷酸化后，导致 Tsc1/Tsc2 复合物解离，从而激活 mTOR，激活后的 mTOR(16.15 节) 增强蛋白合成。

Akt/PKB 增殖功能依赖于其对细胞生长分裂循环，即细胞周期进展重要蛋白的干扰。我们将在第 8 章中学习到更多关于细胞周期这一复杂机制的知识。

除此之外，Akt/PKB 还能使控制细胞蛋白合成速率的相关蛋白发生巨大变化。Akt/PKB 磷酸化一个叫 TSC2 的蛋白，这种蛋白能通过中介物诱导激活 mTOR 激酶，而激活后的 mTOR 激酶可磷酸化一种翻译抑制因子 4EP-BP，并使之失活。同时，激活的 mTOR 激酶还磷酸化并激活一种翻译激活因子 p70S6 激酶，这些变化使 Akt/PKB 能提高一类 mRNA 的翻译起始效率，加速蛋白质合成，利于胞内蛋白的积累，从而促进细胞生长（而不是增殖）（我们将在 16.15 节回到这一通路详细讨论有关细节）。关于 Akt/PKB 具促进生长的活性的证据来自转基因小鼠（图 6.20）：胰腺表达持续活化的 Akt/PKB 突变体的转基因小鼠，其胰腺细胞直径是正常细胞的 2 倍（几乎是 4 倍体积）！

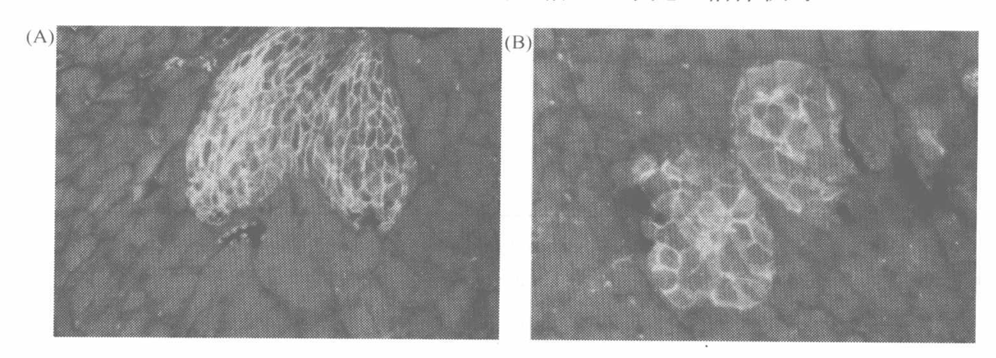


图 6.20 Akt/PKB 及其对细胞生长的控制 胰岛的内分泌细胞正常情况下当血糖浓度升高时分泌胰岛素。(A) 正常胰岛的显微图。(B) 如果组成性激活的 Akt/PKB 选择性地在胰岛细胞里表达，这些细胞会长成正常细胞体积的 4 倍还要大。(From R. L. Tuttle et al., Nat. Med. 7：1133-1137，2001.)

有证据表明还有其他的细胞蛋白通过 PH3 结构域与 PIP3 相结合，并且这种结合利于它们相关功能的激活。在这些具有 PH 结构域的蛋白中，有一组具类似 Sos 作用的鸟嘌呤核苷酸交换因子（GEF），能激活各种与 Ras 蛋白有些联系的小 GTPase。这一类的 GTPase 属于 Rho 信号蛋白家族，这一家族包括 Rho、Rac 和 Cdc42 三个成员。如同 Ras，这些 Rho 蛋白在两种形式间转换，结合 GTP 时作为有活性的信号分子，而结合 GDP 时没有信号活性。Rho-GEF 一旦结合 PIP3 后就被活化，对 Rho 蛋白产生作用，就如同 Sos 对 Ras 蛋白的作用一样。这些 Rho-GEF 能解离结合的 GDP，使 GTP 结合上来，从而激活 Rho。

以这种方式激活后，Rho 蛋白具有与 Ras 显著不同的功能：参与细胞骨架以及细胞与胞外环境联系的重建。通过这种方式，Rho 样蛋白控制细胞形状、迁移以及癌细胞的转移。例如，Cdc42 与肌动蛋白细胞骨架重组有关，并参与控制细胞**线状伪足**，一种细胞用来探知外部环境的细胞膜指状小突触；Rac 则参与形成**片状伪足**，一种活动细胞前沿从细胞膜上延伸出来的褶皱。这些过程与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关，我们将在第 14 章深入讨论其作用机制。

在多种肿瘤细胞类型中都存在 PI 代谢和 Akt/PKB 相关通路的异常失调，而这种失调很多时候与 Ras 的癌蛋白作用并无关系（表 6.4）。PI3K 在一些卵巢癌中过表达，

具有高度活性。在其他肿瘤如淋巴瘤、头颈外科肿瘤和结直肠癌中，Akt/PKB 酶也过表达，导致过度活化。

表 6.4　PI3K 通路在人类肿瘤中的改变

癌症类型	改变类型
成胶质细胞瘤(25%～50%)	PTEN 突变
宫颈癌	PTEN 突变;AKT2 扩增
	PI3K 扩增;PI3K p85α 突变
乳腺癌	Akt 1 活性增强;AKT2 扩增
	PTEN 突变
子宫内膜癌(35%)	PTEN 突变;PTEN 甲基化[a]
肝细胞癌	PTEN 突变
黑色素瘤	PTEN 突变;PTEN 甲基化[a]
肺癌	PTEN 突变
肾细胞癌	PTEN 突变
甲状腺癌	PTEN 突变;Akt/PKB 过表达
淋巴瘤	PTEN 突变
前列腺癌(40%～50%)	PTEN 突变
结肠癌(>30%)	Akt/PKB 过表达;PI3K 突变

a 甲基化是指一个基因启动子区的胞嘧啶发生甲基化，从而使该基因的转录受到抑制；参见 7.8 节。

改编自 I. Vivanco and C. L. Sawyers, Nat. Rev. Cancer 2:489-501, 2002.

近 1/3 的结肠癌中存在 PI3K 调节亚基 p110α 突变，导致 PI3K 过度活化，但 Akt/PKB 失调更主要的诱因是 PTEN 功能失活，这在多种人类肿瘤都有发现（表 6.4）。在许多不同肿瘤，包括乳癌、前列腺癌和胶质细胞瘤中，染色体的基因突变或 DNA 甲基化使表达受抑制，导致 PTEN 丧失活性。总计 30%～40%的人类肿瘤中都存在 PTEN 活性的缺失。由此导致 PIP3 磷酸化水平上升，进而引发一系列以上列举的下游事件。PTEN 这种抑制细胞增殖的行为表明其具有抑瘤基因的功能。关于抑瘤基因我们将在第 7 章进行讨论。

6.7　Ras 调控的第三条通路：通过 Ras 同源物 Ral 进行的调控

Ras 下游三大效应通路中第三条通路涉及一对 Ras 样蛋白：Ral-A 和 Ral-B，这两种蛋白与 Ras 有 58%的序列同源性（见信息栏 6.4）。同 Ras 一样，Ral 蛋白的功能激活依赖于 GTP 取代 GDP 与之相结合。

信息栏 6.4　Ras 是一个相似蛋白大家族成员的原型　Ras 只是一类叫做小 G 蛋白的蛋白家族中的一个成员，这个蛋白家族由 35 个结构类似的蛋白组成，与其他含异源三聚体的鸟苷酸结合蛋白相区别，后者与七次跨膜细胞表面受体关联并受其激活（见图 5.25）。绝大多数小 G 蛋白都有一个三字母的名称，每个名称都是由最初发现和命名的 Ras 蛋白衍生出来的。如 Ral、Rac、Ran、Rho 等（Cdc42 蛋白是 Rho 家族的一个成员，其因为是通过酵母遗传研究中发现而保留了其特殊的命名）。

这些蛋白序列各异，但都有一相似序列，位于各自结合和水解鸟苷酸的位点。和 Ras 一样，每个小 G 蛋白的运作，都是以一种二元转换方式，进行 GTP-GDP-GTP 的循环往复，呈现开或关的

状态。跟 Ras 一样，这些蛋白每个都有其特异的鸟苷酸交换因子来激活它，以及特异的 GTPase 激活蛋白来诱导它的 GTPase 活性。

每个小 G 蛋白都控制一种不同的细胞生理或生化过程，包括细胞骨架结构和凋亡的调控。有一种甚至能调节蛋白出入核孔。这些不同的细胞生物学过程唯一的共同点就是，需要被某类二元转换机制调控，而这正是小 G 蛋白最适合的运作方式。

Ras 和 Ral 的通讯由 Ral 鸟嘌呤核苷酸交换因子（Ral-GEF）介导，Ral-GEF 能促进 Ral 蛋白释放 GDP，结合 GTP，与 Sos 对 Ras 蛋白的作用类似。除了它的 GEF 结构域，每个 Ral-GEF 还有一个能结合活性状态的 Ras 的口袋形结构域。Ral-GEF 与 Ras 的结合，使 Ral-GEF 定位在细胞膜的内表面，而且还能引起 Ral-GEF 构相改变，激活其内在的鸟嘌呤核苷酸交换因子（GEF）的活性。

Ral-A 和 Ral-B 蛋白被激活，进一步调节信号通路的下游靶基因（图 6.21）。例如，Ral 通路能使 Rho 蛋白家族的两种蛋白 Cdc42 和 Rac 失活。Rac 也能发出分裂信号，并且通过刺激活性氧簇的产生来拮抗 Rho 家族一些蛋白的作用。尽管目前机制并不清楚，Ral 蛋白可能在促进细胞迁移，促使癌细胞侵袭和转移方面扮演重要作用。

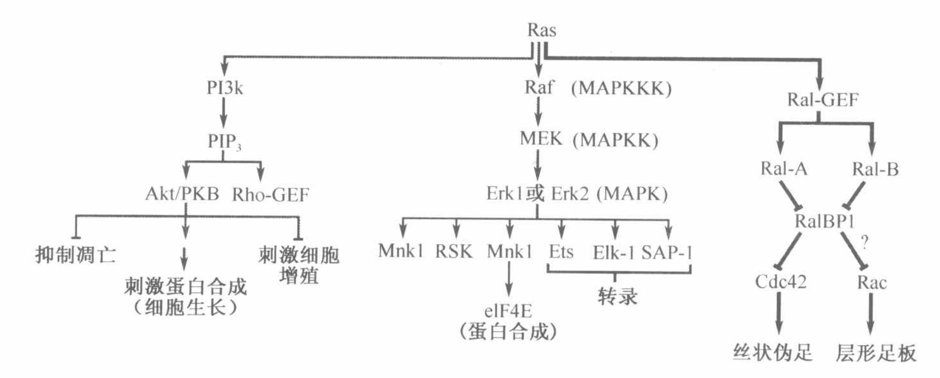


图 6.21 Ral 及其对细胞骨架的控制 Ras 和 Ral-GEF（红色）的结合使后者能激活 Ral 蛋白 Ral-A 和 Ral-B。形成结合有 GTP 的 Ral 蛋白接着激活多个下游通路；主要的有激活 Cdc42 和 Rac 的通路，而激活的 Rac 通过其对肌动蛋白细胞骨架的作用增强细胞迁移能力。

Ras 蛋白是一种具有多重效应的癌蛋白，这可从生化层面上自 Ras 发散出的三条下游信号通路予以解释。很容易把每一种与 Ras 癌蛋白相关的表型（如锚着非依赖性、存活、增殖和生物合成等）归为三种 Ras 效应蛋白中某一种蛋白特异性作用的结果，但事实上，事情往往要复杂得多：绝大多数表型似乎是这些效应蛋白共同作用形成的。

事情的复杂还体现在另外两个方面。首先，我们这里是把 Ras 蛋白作为单一蛋白进行讨论的，然而事实上 Ras 家族有 4 种蛋白（1 种 H-Ras，1 种 N-Ras，2 种 K-Ras），这 4 种蛋白在细胞定位不同，作用方式也略有差异。其次，我们列举的三种蛋白（Raf、PI3K 和 Ral-GEF）并不能包括所有的 Ras 效应蛋白。已经清楚 Ras 可以跟许多其他蛋白结合，这些效应蛋白目前了解不多，总之其能诱导细胞内产生其他变化。

在任何信号通路中，那些处于上游的个体比那些下游的都具有强大得多的力量和影响力。Ras 癌蛋白（或某一 Ras 的上游调控蛋白发出的刺激信号）能同时激活多条信号通路，诱发多种通常是细胞恶性转化过程中才能获得的细胞表型变化。而 Ras 下游通路中的某一条通路异常则只能导致其中的一小部分表型变化，因而产生的准癌细胞的生长优势也小得多。这一点由我们前面提到的编码 B-Raf 激酶的基因突变体可以很好地说明，B-Raf 也通过与 Ras 结合而激活，其突变体在许多人黑色素瘤中均有发现，这种突变体可以形成致癌性的 BRAF，但其转化活性只有发生甘氨酸-缬氨酸替换突变激活的 Ras 癌蛋白的 1/50。理论上，越是下游的信号分子，当其突变时产生的利于细胞癌变转化的作用（如选择优势）就越小，因此在人类肿瘤细胞中很少见到这些突变。

6.8 介导信号从胞膜直接传到胞核的 Jak-STAT 通路

如 5.7 节所述，对细胞因子——一类刺激血管生成系统成分的生长因子的研究揭示了一些结构上与上一章中介绍到的大多数生长因子受体略微不同的受体分子。这些特殊的受体蛋白没有共价结合的酪氨酸激酶结构域，相反，它们与 Jak（Janus 激酶）一类的酪氨酸激酶形成非共价复合物（图 6.22）。这些蛋白包括干扰素（IFN）受体，促红细胞生成素（EPO）受体和血小板生成素（TPO）受体。干扰素是免疫细胞功能重要调节蛋白，我们在第 15 章将学到，其余两种则分别调控**红细胞生成**和**血小板生成**。

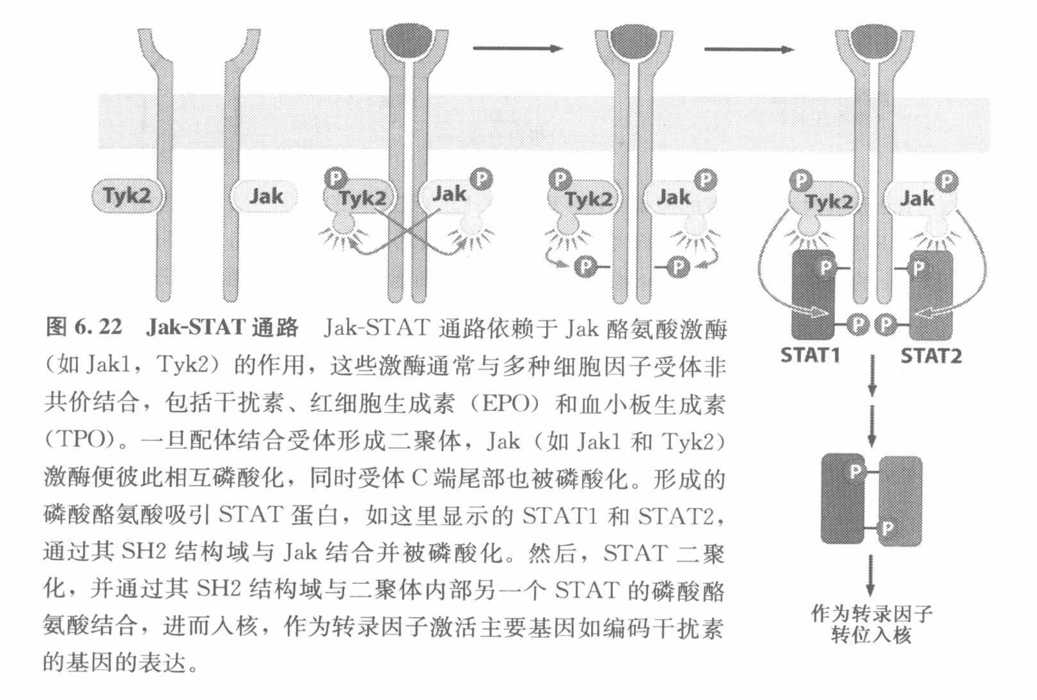


图 6.22 Jak-STAT 通路 Jak-STAT 通路依赖于 Jak 酪氨酸激酶（如 Jak1，Tyk2）的作用，这些激酶通常与多种细胞因子受体非共价结合，包括干扰素、红细胞生成素（EPO）和血小板生成素（TPO）。一旦配体结合受体形成二聚体，Jak（如 Jak1 和 Tyk2）激酶便彼此相互磷酸化，同时受体 C 端尾部也被磷酸化。形成的磷酸酪氨酸吸引 STAT 蛋白，如这里显示的 STAT1 和 STAT2，通过其 SH2 结构域与 Jak 结合并被磷酸化。然后，STAT 二聚化，并通过其 SH2 结构域与二聚体内部另一个 STAT 的磷酸酪氨酸结合，进而入核，作为转录因子激活主要基因如编码干扰素的基因的表达。

由配体结合介导的受体二聚化后，Jak 酶与结合的每个受体分子一起将二聚体中另一个受体分子酪氨酸磷酸化，其原理同 EGF-R 和 PDGF-R 受体在被配体激活后二聚体两亚基之间进行交互磷酸化是一样的。形成的磷酸化酪氨酸吸引并结合含有 SH2 结构域的转录因子 STAT（信号转导和转录激活蛋白）。一旦与受体结合，这些 STAT 被 Jak 磷酸化，形成既有 SH2 基团又有磷酸化酪氨酸的单个 STAT 分子。重要的是，STAT 的 SH2 基团能特异性地结合 STAT 上形成的磷酸化酪氨酸残基，因此 STAT-STAT 二聚体形成，其中的每个 STAT 都通过其 SH2 结构域与二聚体另一 STAT 的磷酸化酪氨酸相结合。形成的 STAT 二聚体迁移入核，作为转录因子发挥其功能（图 6.22）。

STAT 可以激活对细胞增殖和细胞存活极其重要的靶基因，包括如 *myc*、细胞周期蛋白 D2 和 D3（能使细胞通过生长-分裂周期演进）以及编码强抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 的基因等。除了可磷酸化 STAT，Jak 还可磷酸化那些能激活其他促有丝分裂通路的底物，包括前面介绍的 Ras-MAPK 通路。

目前 STAT 与癌症相关的证据正迅速增多。有关 STAT 在癌症发生发展中作用最生动的例子来自 Stat3，在 Stat3 中插入一对半胱氨酸残基，Stat3 自发二聚化，使其形成稳定的共价二硫键而交联。这样形成的 Stat3 突变二聚体在结构和功能上均与正常情况下被 Jak 磷酸化后生成的 Stat3 二聚体相类似，但其作为核内转录因子是组成性激活的，因此具有能转化 NIH 3T3 和其他永生化小鼠细胞的致癌蛋白功能（图 6.23）。

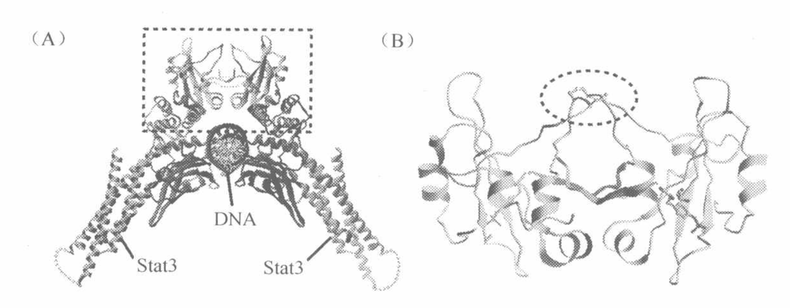


图 6.23 Stat3 的持续性激活 （A）Stat3 蛋白通过其 C 端区域形成二聚体转录因子，跨坐于 DNA 双螺旋上（灰色环状结构，中部）。（B）采用定点突变，在 C 端结构域插入两个酪氨酸残基，使其形成共价二聚体。图 A 中绿色的 C 端结构域（在虚线框中的部分）的详细结构显示在这里。连接两个单体的二硫键在图上部的中间，显示为黄色和绿色（虚线线环）。（From J. Bromberg et al.，Cell 98：295-303，1999.）

已知 Stat3 在多种人类肿瘤中被组成性激活，如在许多黑素瘤中，Stat3 主要是被 Src 激活，而 Src 本身在这些肿瘤细胞里是组成性激活的；至少有 4 种非受体酪氨酸激酶的 Src 家族成员蛋白能磷酸化并激活 Stat3。这也突出表明了 STAT 能够在胞浆中被非受体偶联的酪氨酸激酶而不是 Jak 活化。这些黑素瘤细胞中对 Src 的抑制能使 Stat3 失活，导致细胞凋亡，表明 Stat3 在保证肿瘤细胞存活上的重要作用。

在多数乳癌细胞中，发现 Stat3 被组成性活化，其中一些细胞中 Stat3 的磷酸化是由 Src 和 Jak 共同作用完成的。如同黑素瘤细胞，这些乳癌细胞中 Stat3 活性的逆转导致生长抑制和细胞凋亡。在几乎所有头颈外肿瘤中，Stat3 也是被组成性活化的，活化机制可能是通过 EGF 受体的作用。综上所述，各种证据汇合在一起，证明 STAT 是人类多种肿瘤转化过程中的重要调节物。

6.9 与生长因子受体信号趋同的细胞黏着受体信号

在上一章中，我们读到细胞会持续性地监控其与细胞外基质（ECM）成分的连接。一方面，细胞通过整联蛋白与细胞外基质的分子粘连后，释放出存活信号到细胞质中，从而降低细胞进入凋亡的可能性。同时，由细胞内信号引起的整联蛋白的激活，能通过刺激在胞膜特异位点的整联蛋白分子形成与 ECM 的新连接，促进细胞的迁移能力。因此，整联蛋白具有三个功能：①使细胞与 ECM 相连接；②通知细胞是否已经与某些 ECM 成分连接；③通过断开与 ECM 的旧连接，形成新连接促进细胞的迁移能力。

如上一章中所述，整联蛋白能在一小块叫黏着斑的固定面积上聚集生成许多与 ECM 的连接（图 5.28A）。这种聚集能引起黏着斑激酶（FAK）的激活，FAK 是一类类似 Src 的非受体酪氨酸激酶，与一些整联蛋白分子 β 亚基的细胞内尾部相连，当整联蛋白聚集在黏着斑时可能通过反式磷酸化作用被磷酸化。FAK 上被磷酸化后的酪氨酸残基可以为 Src 提供锚定位点（图 6.24A）。锚定后的 Src 接着磷酸化 FAK 上的其他酪氨酸残基，由此形成的磷酸化的酪氨酸残基成为其他含 SH2 结构域的信号分子，如 Grb2、Shc、PI3K 和 PLC-γ 的锚定位点。也有证据表明 Grb2 一旦结合被磷酸化的 FAK 后，能重新招募 Sos，后者接着激活其下游的靶基因，包括 Ras 和 PI3K。显然，目前整联蛋白下游信号的许多复杂问题仍待解决（图 6.24B）。

已积累的证据显示一条通路最少包括以下这些元件：ECM → integrin → Sos → Ras → Erk。

整联蛋白与酪氨酸激酶通路的相似是显著的：酪氨酸激酶受体与细胞外的生长因子配体结合，而整联蛋白与细胞外基质结合。一旦激活，这两类感应器激活同样的下游信号级联。而且，一些整联蛋白还与酪氨酸激酶受体共定位，并且这种关联似乎是这两类受体激活都必需的。

这种信号通路间的趋同似乎能解释 Ras 癌蛋白其中一个很重要的细胞生物学效应——其能使细胞以锚着非依赖性的方式生长。细胞正常情况下依赖整联蛋白信号来衡量正常 Ras 蛋白的活化情况，缺少这种信号时，细胞会认为是已经无法与细胞外基质相连接。这将使细胞生长-分裂的周期演进受到阻滞，或者更剧烈，引起细胞进入叫失巢凋亡的程序性死亡状态，失巢凋亡通常在细胞失去与固体底物的黏着时被诱导发生，而对这种凋亡的逃避似乎代表了乳癌启动阶段的最初几步之一（图 6.25）。

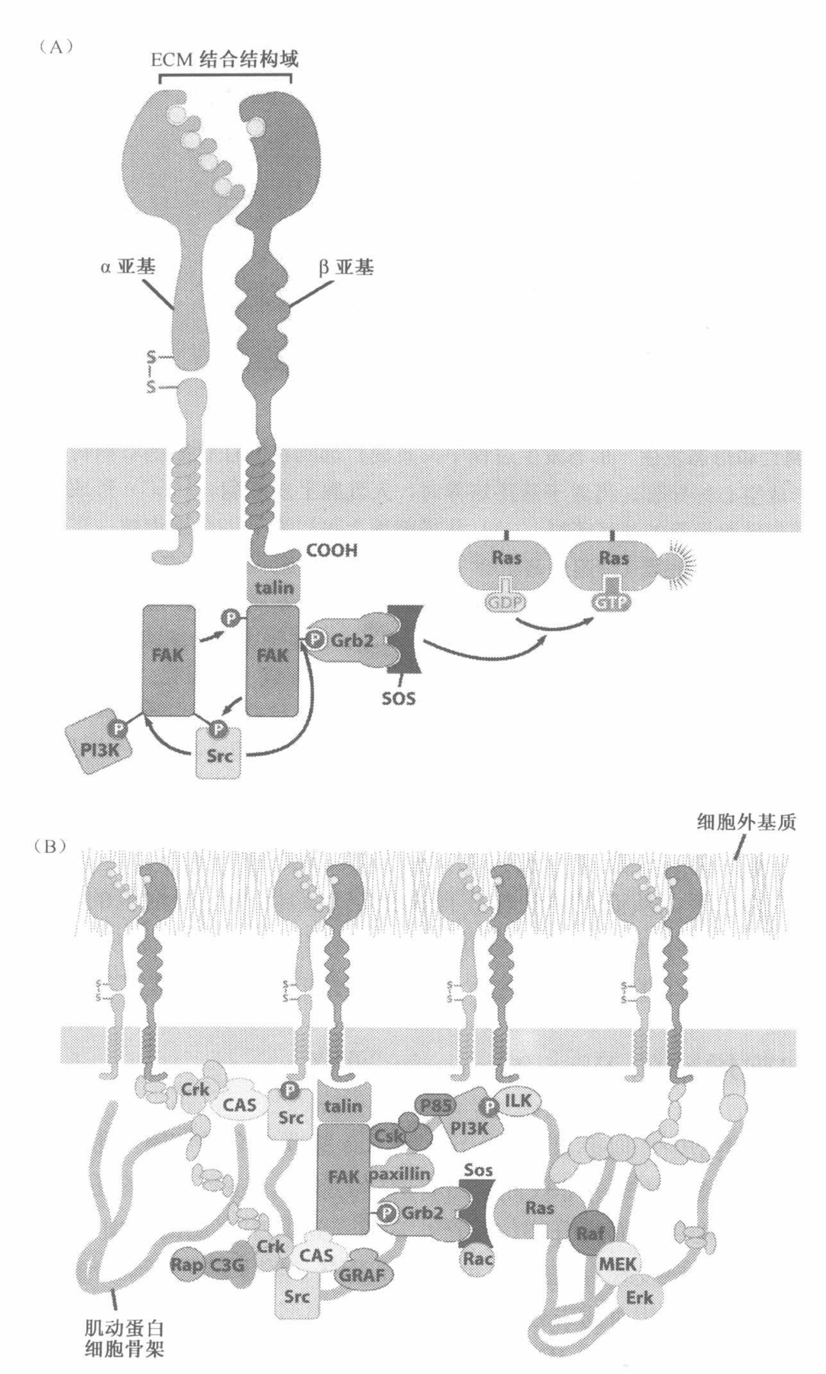


图 6.24 整联蛋白信号转导 (A) 整联蛋白由 α + β 二聚体组成，除了把细胞骨架与细胞外基质连在一起（见图 5.28B），二聚体胞外功能区与细胞外基质的结合引发一系列的细胞内信号转导蛋白的结合反应，如斑黏着蛋白激酶（FAK；粉色），结合到 β 亚基的胞内结构域。形成的反式磷酸化作用及对含 SH2 结构域信号分子的吸引，释放出信号激活同一通路上大量受配体激活的生长因子受体。(B) 如图所示，图 A 只表示复合物的一部分，这种目前了解甚少的复合物由许多信号转导分子组成，其与 ECM 结合后能与各种整联蛋白 β 亚基的胞内结构域结合。(Adapted from C. Miranti and J. Brugge, Nat. Cell Biol. 4: E83-E90, 2002.)

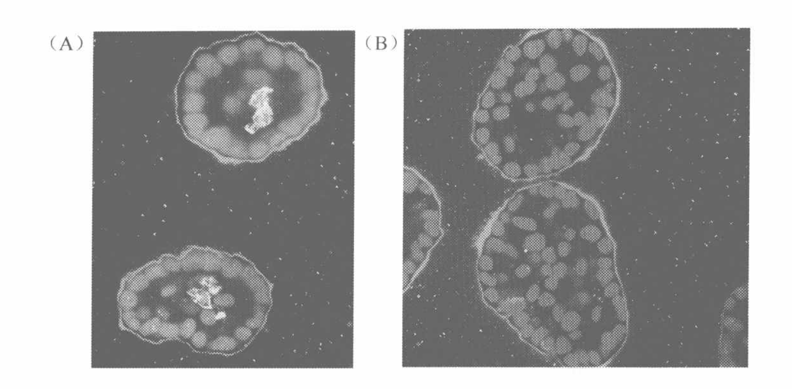


图 6.25　失巢凋亡和形态发生　形态发生过程中失巢凋亡起到在圆柱状细胞堆积物中间挖掘通道的作用，从而形成空心的导管。当置于悬浮培养时，人乳腺上皮细胞（MEC）形成腺泡——一种至少在表面上类似乳腺导管的球状簇群。(A) 从横截面上可以看到一个腺泡被一层由细胞合成的含 laminin-5（红色）的基底膜（细胞外基质的一种形式）所环绕。那些能成功通过整联蛋白粘结到基底膜的细胞是健康的，其核（蓝色）也较大。而那些不能与基底膜直接连接的细胞发生失巢凋亡，形成一种预示凋亡的蛋白质（激活的 caspase-3，绿色）；这些中间的细胞同时呈现凋亡的另一种标志，即片段化的核（蓝色）。这些细胞的丢失会在腺泡中形成一个内腔。(B) 在乳腺癌发展的早期，正常的失巢凋亡及其乳腺导管空腔的挖掘作用能被一些抗凋亡蛋白所阻抑。在这里，抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 蛋白在 MEC 的表达导致凋亡的抑制，从而使空腔被填满，响应一些在乳腺癌发展起始阶段出现的导管异常增生和原位癌现象。(Courtesy of J. Debnath and J. Brugge.)

总之，这些不同的观察提示致癌性的 Ras 能模仿细胞外基质与整联蛋白黏着后其中一种关键的下游信号，从而促使细胞获得非锚定依赖性地生长增殖的特性。实际上，致癌性的 Ras 可能迷惑细胞，使其认为整联蛋白已经与 ECM 成分成功结合，因此，即使在这种结合并没有发生的情况下，也允许 Ras 转化的细胞继续增殖。

6.10　促细胞增殖的 Wnt-β-catenin 通路

在大多数细胞类型中，似乎 RTK → Sos → Ras 级联在介导细胞对胞外分裂信号的反应中占主导地位，但细胞内却并非仅此通路有这样的效应。还有其他的还未完全弄清的信号通路也能对影响在细胞表面的分裂信号产生应答。这其中突出的是由 Wnt 因子控制的通路。在人的各种组织已发现有超过 12 种的 Wnt 因子。除了转导有丝分裂信号，这个通路还能使细胞保持在一种相对的未分化状态——一些类型肿瘤细胞的一个重要属性。

如我们在 5.7 节所学到的，Wnt 通路的分子途径是与 RTK → Sos → Ras → Raf → Erk 通路完全不同的。Wnt 因子结合 Frizzled 受体，抑制糖原合酶-3β（GSK-3β）的活性。在缺乏 Wnt 时，GSK-3β 磷酸化几种重要的底物蛋白，作为其进行后续降解的标签。这其中最重要的一种底物是 β-catenin。β-catenin 正常情况下在细胞中以 3 种状态存在：或者结合到细胞黏着蛋白受体的胞内结构区，如 E-cadherin（图 6.26A）；或者扮演另一种完全不同的角色，存在于胞浆的一个可溶库里，并且很快地降解，存在时间仅不足 20min；或者存在细胞核里面，作为一个转录因子的重要元件。

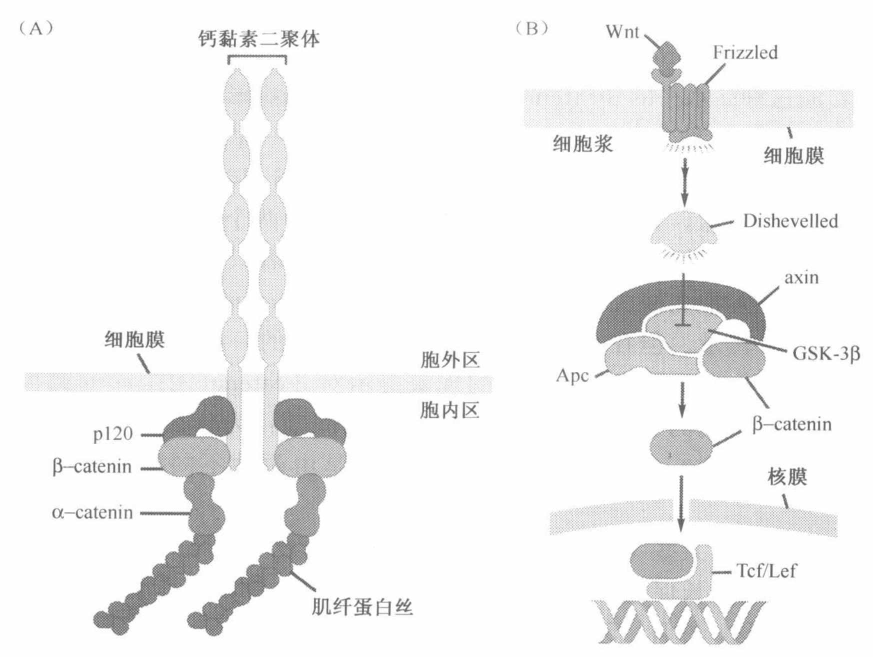


图 6.26 β-catenin 的多种功能 (A) 如同许多整联蛋白，钙黏素（浅绿色）是一种跨膜蛋白，与细胞外空间有联系，经中介蛋白与肌动蛋白细胞骨架（深红）相连（例如，E-钙黏素分子从一个细胞凸出，能结合相邻细胞的另一个 E-钙黏素分子，导致两个细胞间的黏附连接）。这里显示的是 β-catenin（浅蓝色）作为一个衔接物（与 α-catenin 和 P120 一起）形成钙黏素和肌动蛋白细胞骨架之间的机械连接。(B) 如图 5.24，Wnt 蛋白（深红）通过结合到其 Frizzled 受体（深绿），经 Dishevelled 作用，抑制 GSK-3β（粉色）的活性，阻止 GSK-3β 磷酸化包括 β-catenin（浅蓝）在内的底物。逃脱降解的 β-catenin 在胞浆和胞核里累积，而一入核，β-catenin 便与 Tcf/Lef 转录因子结合推动一系列相应靶基因，包括细胞增殖相关基因的表达。

我们把注意力集中在与 E-cadherin 无关的 β-catenin 分子库上。正常情况下，在它合成不久，β-catenin 就会与其他两种细胞蛋白——Apc（腺瘤性结肠息肉蛋白）和 axin 形成多蛋白复合物。这些蛋白使 β-catenin 与其分解者 GSK-3β 结合（图 6.26B）。通过磷酸化 β- catenin，GSK-3β 确保 β-catenin 被**泛素化标签**，从而导致 β-catenin 的快速降解；这也解释了正常情况下稳定状态的 β-catenin 在胞浆内总保持低浓度的原因。我们将在后面详细讨论这种降解机制（信息栏 7.8）。

当 Wnt 信号激活时，GSK-3β 的降解作用被阻抑，β-catenin 免于降解，半衰期从 20min 增长为 1～2h，其稳态浓度也相应的增加，累积的 β-catenin 便转移进入细胞核，结合 Tcf/Lef 蛋白，激活转录（图 6.26B）。β-catenin 与 Tcf/Lef 形成的转录因子复合物能激活多个重要靶基因，包括那些编码细胞生长增殖相关蛋白的基因，如 cyclin D1 和 Myc，这些基因我们将在第 8 章学习到。

如前所述，除 β-catenin 外，GSK-3β 还可磷酸化其他一些重要的生长调节蛋白。GSK-3β 可通过给 cyclin D1 磷酸化标签而促进其快速降解。因此，Wnt 通路实际上在转录水平和翻译后水平两个层次上调节 cyclin D1 的表达水平。Wnt 通路的多种作用机制表明，除了其最初被发现的作为形态发生因子的角色，Wnt 因子还是一种强分裂原

促进素，其起到的作用如同许多受体酪氨酸激酶的配体一样。此外，我们将在第 7 章学习到，高水平的 β-catenin 是小肠干细胞保持未分化状态、不分化成小肠壁特异细胞的重要保证，而这种高水平的 β-catenin 也被证明正是结肠癌形成的重要因素。

β-catenin 的另一种角色，如上所述，是参与形成一种细胞质复合物，使细胞表面黏附受体，如 E-cadherin，连接到细胞骨架上（图 6.26A）。β-catenin 这两种毫不相关的角色令人迷惑。目前并不清楚是否 β-catenin 的两个库——那些作用于**黏附连接**的和作用于转录调控的——之间存在一种平衡，或者只是细胞完全不相干的两个部分。因此，有人推测缺失 E-cadherin 的细胞中，β-catenin 被解放出来，从而促进转移入核，激活转录。但在突变导致 E-cadherin 缺失的一些癌细胞中，细胞核内的 β-catenin 信号水平并没有升高。类似的现象提示对 β-catenin 两个库的调控可能是独立，不存在相互影响的。然而这又引起了另外的问题：为什么一个蛋白会进化出两种互不相关的功能呢？（在线虫中，这两种功能是由两种不同基因编码的不同蛋白完成的。）

许多乳腺癌中，某些 Wnt 因子的表达水平是正常水平的 4～10 倍，提示可能存在自分泌和旁分泌的生长促进作用。已有显著证据表明在大约 20%晚期前列腺癌中存在 β-catenin 的核转移。并且，5%～7%的前列腺癌出现 β-catenin 的基因突变，其编码的蛋白不能被 GSK-3β 磷酸化，因而在细胞核大量累积（图 6.27）。这种突变在肝癌结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌和黑色素瘤中均有报道。我们将在下一章学到，由于 APC 蛋白——一种促进 β-catenin 降解的蛋白的失活，导致在几乎所有的结肠癌中，β-catenin 的降解机制都是失活的（图 6.26B）。在其他的肿瘤中，这条通路也有可能以目前尚未发现的机制失调。

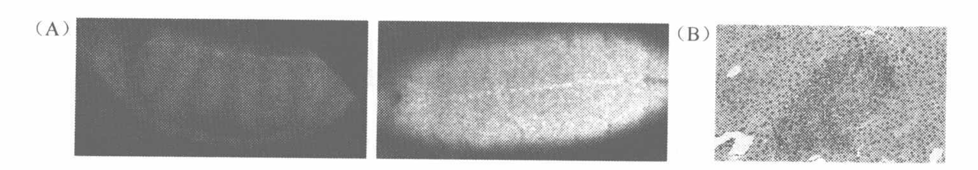


图 6.27　β-catenin 信号通路的调控　β-catenin 水平的升高有多种不同途径。(A) 果蝇胚胎通常以条纹状（淡色条纹，左）方式表达 β-catenin。但当编码 GSK-3β 的基因失活时，高水平的 β-catenin 在整个胚胎中累积（右）。(B) 暴露于特定肝致癌物的小鼠患肝细胞癌（肝癌），其 β-catenin 蛋白发生突变而抵抗 GSK-3β 的磷酸化及其降解作用，因而 β-catenin 水平显著上升。视野内可见的肝细胞胞浆内累积 β-catenin（棕色）是核内 β-catenin 水平（此处未显示）升高的前奏，而核内 β-catenin 通过与 Tcf/Lef 转录因子结合，推动细胞增殖。（A，courtesy of E. F. Wieschaus；B，from T. R. Devereux et al.，Oncogene 18：4726-4733，1999.）

6.11　G 蛋白偶联受体具有促进正常增殖和恶性增殖的双重作用

在上一章中我们讲到，G 蛋白偶联受体是一个跨膜蛋白，迂回七次通过细胞膜。当 G 蛋白偶联受体与细胞外配体结合时，每一个“蜿蜒”的受体可以激活一种或者几种胞浆内的 G 蛋白异源三聚体。之所以称之为异源三聚体是因为 G 蛋白具有三个截然不同

的亚基（Gα、Gβ 和 Gγ），其中 Gα 可以结合 GDP 或者 GTP。以 Ras 蛋白为例，当结合 GTP 时，Gα 完成其活化状态。

一旦被 G 蛋白偶联受体激活，G 蛋白异源三聚体中的 Gα 亚基就会与它的两个伙伴 Gβ 和 Gγ 分离，进一步活化一系列不同的细胞质酶类（图 6.28），其中就包括腺苷酸环化酶和磷脂酶 C-β（PLC-β）。腺苷酸环化酶可以将 ATP 转化为环腺苷酸 cAMP，而磷脂酶 C-β 则通过酶切 PIP2，生成二酰基甘油（DAG）和纤维醇（1，4，5）-三磷酸盐（IP3），其中的（图 6.16B）IP3 是细胞浆中重要的第二信使，具有刺激细胞增殖的功能。

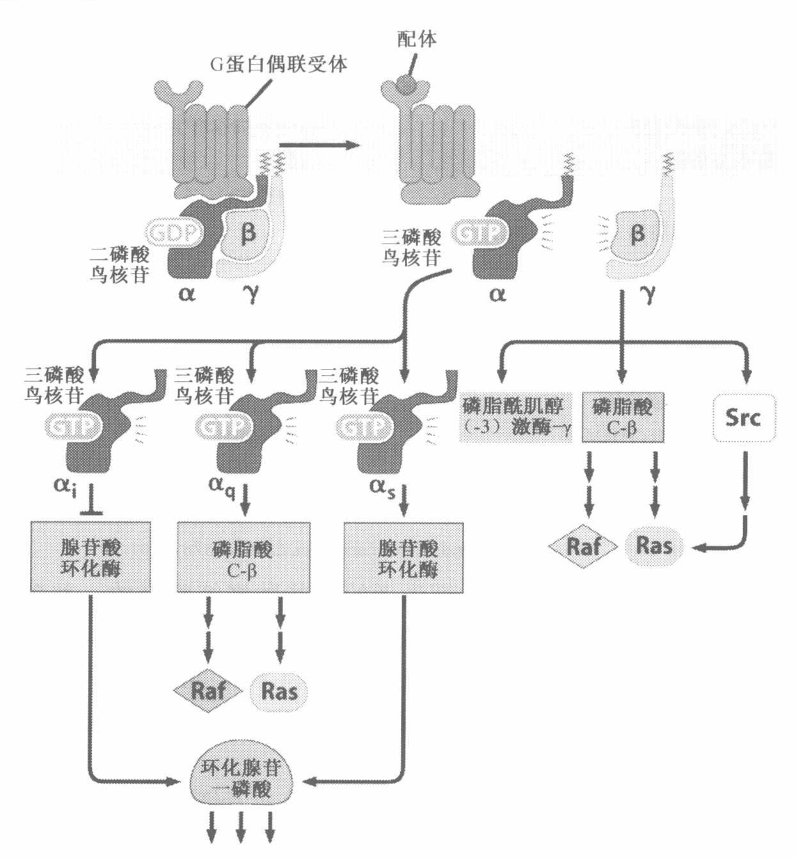


图 6.28　G 蛋白偶联受体　七次跨膜受体可以活化多种异源三聚体 G 蛋白，它们最大的区别在于 Gα 亚基。一旦被 GPCR 所激活，Gα 亚基从 Gβ 和 Gγ 脱离，进而激活或者抑制细胞质中的酶类，在这里仅仅显示了其中的两个——腺苷酸环化酶和磷脂酶 C-β。这些酶类再根据细胞类型不同而依次产生促细胞分裂或者抑制细胞分裂的作用。同时，Gβ+Gγ 二聚体也可以活化它们的下游效应蛋白，包括磷脂酰肌醇（-3）激酶（PI3Kγ）、磷脂酶 C-β（PLC-β）和 Src。本图表仅仅提供了多种 G 蛋白及已知 Gα 和 Gβ+Gγ 效应蛋白的示意图。

有证据表明，就连人们研究的第一个细胞内癌蛋白-Src 激酶，也可以被某些 GTP 结合的 Gα 亚基所激活。同时，G 蛋白异源三聚体中的另外两个亚基复合物 Gβ 和 Gγ 也被发现可以激活其他重要的细胞有丝分裂信号蛋白，如磷脂酰肌醇(-3)激酶（PI3K）的某一种形式。G 蛋白偶联受体可以激活有丝分裂通路的能力提示，

这些受体以及相关联G蛋白引起的信号通路的失调可能会在细胞转化和肿瘤发生过程中发挥作用。这种推测是通过分析多种人类肿瘤细胞类型后得出的结论（见表6.5）。

表6.5 G蛋白偶联受体及G蛋白偶联受体在肿瘤发病过程中的作用

G蛋白或受体	肿瘤类型
G蛋白活化型突变	
$G\alpha_5$	甲状腺瘤/癌、垂体瘤
$G\alpha_{i2}$	卵巢肿瘤、肾上腺皮质肿瘤
G蛋白偶联受体活化型突变	
促甲状腺激素受体	甲状腺瘤/癌
促卵泡成熟激素受体	卵巢肿瘤
促黄体(生成)激素受体	Leydig细胞增生
肠促胰酶肽-2受体	大肠癌
Ca^{2+}-sensing受体	多种肿瘤
自分泌或旁分泌型活化	
Neuromedin B受体	小细胞肺癌
Neurotensin受体	前列腺癌和小细胞肺癌
胃泌素受体	胃癌和小细胞肺癌
肠促胰酶肽-2受体	胰腺增生和胰腺癌、胃肠道癌、小细胞肺癌
病毒编码G蛋白偶联受体	
卡博氏肉瘤疱疹病毒(HHV-8)	卡博氏肉瘤
Saimiri疱疹病毒	灵长类动物白血病和淋巴瘤
Jaagsiekte绵羊反转录病毒	绵羊肺癌

改编自M. J. Marinissen and J. S. Gutkind, Trends Pharmacol. Sci. 22:368-376, 2001.

以小细胞肺癌（SCLC）为例，吸烟患者的某些肿瘤细胞释放一些独特的肽因子，某些具有类似神经肽的特性。在某些非小细胞肺癌中，肿瘤细胞可以自发分泌bombesin（胃泌素释放肽，GRP）、缓激肽、缩胆囊素（CCK）、胃泌素、神经加压素和抗利尿激素。同时，表达G蛋白偶联受体的细胞可以识别并结合这些释放出来的因子，从而形成了一个自分泌信号环路。

在小细胞肺癌中，自分泌环路可以促进细胞增殖或者细胞生存，有直接的实验室依据：实验人员在体外培养的小细胞肺癌细胞中加入可以结合并中和细胞释放的自分泌生长因子的抗体（如胃泌素释放肽，GRP）共同孵育，则在某些小细胞肺癌细胞株，这样的处理会导致细胞生长迅速停止，甚至发生凋亡，这种反应提示这些细胞是依赖于GRP-自分泌信号环路而生存。这也为小细胞肺癌患者的治疗提供了一种新的治疗方式，即利用GRP-中和抗体。利用该方法治疗的12例小细胞肺癌患者中，1例达到了完全缓解，并有4例患者肿瘤部分缩小。

在另一类的肿瘤——甲状腺瘤和甲状腺癌中，编码促甲状腺激素受体（一种G蛋白偶联受体）的基因经常发生点突变，这种点突变导致TSH受体可以不依赖于配体而构成性地活化，进而使得强大的有丝分裂信号释放到甲状腺上皮细胞中。在其他的甲状腺中，Gα发生了点突变，这种点突变使得Gα失去了通过自身GTP酶活性自我关闭的功能，其结果类似于激活了Ras信号通路。总之，在17种编码Gα亚基

的人类基因中，至少有10种已经被发现在某些类型的细胞和不同的人类肿瘤中发挥癌基因的功能。

对于G蛋白偶联受体来说，名声最坏的事情发生在某些疱疹病毒（如人8型疱疹病毒HHV-8，另称卡博氏肉瘤病毒KSHV）感染时。这种病毒经常导致艾滋病患者发生血管肿瘤。在病毒进化过程中的某一点上，病毒获得了一个编码G蛋白偶联受体的细胞基因，这个基因在病毒状态下被重新塑造，导致编码的受体可以不依赖于配体而活化，结果导致HHV-8感染的上皮细胞（排列在血管壁上的上皮细胞）分泌血管上皮生长因子（VEGF），释放的VEGF通过结合上皮细胞表面的受体而形成自分泌信号环路，驱动这些细胞的增殖。

6.12 其他四个信号通路通过不同的方式在正常和恶性增殖中发挥作用

其他的四条信号通路在某些类型的肿瘤发生过程中也发挥重要作用。这些通路的共同点在于：信号通路被激活时将调控细胞内类似于β-catenin的“双重定位蛋白”，这些蛋白在正常状态下定位于细胞膜上，而一旦被某些信号激活则会分派到细胞核中，作为某些特定的细胞转录因子的组成部分驱动基因表达。在上一章中，我们已经介绍了这些受体是如何控制相应信号通路的，本章我们将简要地总结一下这4条通路的下游事件（图6.29），并举例说明每条通路在人类肿瘤中的异常调控（图6.30）。

Nuclear factor-κB 本信号系统包括一类在某些肿瘤发生中发挥作用的核因子-κB类转录因子。人们在一类快速转化的火鸡逆转录病毒中发现了癌基因*rel*，在B细胞淋巴瘤网状内皮组织增殖中发挥重要作用。这是首次发现这条通路在肿瘤发生中具有重要作用。后来在研究调控免疫球蛋白表达的转录因子时发现Rel属于某一类转录因子家族，后命名为NF-κB。这些蛋白在细胞浆中形成同源和异源二聚体。

最常见的NF-κB异源二聚体由p65和p50组成。通常，NF-κB被另一个多肽-IκB（NF-κB抑制因子）扣押在细胞浆中。在这种状态下，这个信号系统保持沉默。但是，在接收到某些不同来源的信号时，IκB被磷酸化并迅速降解（回想β-catenin在胞浆中磷酸化后也是同样的命运）。结果，NF-κB从IκB的禁锢中解放，并移动到细胞核中，进而激活一大群至少150个靶基因的表达。

引起IκB毁灭并导致NF-κB信号通路活化的激酶（称为IκB激酶或者简称IKK）本身也被众多的因子所激活，包括肿瘤坏死因子、白细胞介素-1β（免疫系统中参与免疫应答的细胞外因子）和脂多糖（细菌感染的标记）、活性氧自由基（ROS）、抗肿瘤药物以及λ射线等。在肿瘤发生过程中，NF-κB对细胞存活和增殖具有重要影响。一旦到达细胞核，NF-κB可以引起一系列重要的抗凋亡蛋白的基因表达，如Bcl-2、IAP-1和IAP-2（我们将在第9章详细介绍这些蛋白）。同时，NF-κB可以通过诱导细胞周期调节机制中的重要成员*myc*和cyclin D1基因的表达，参与细胞有丝分裂（见第8章）。因此，NF-κB可以保护细胞免于细胞凋亡，同时驱动细胞增殖。

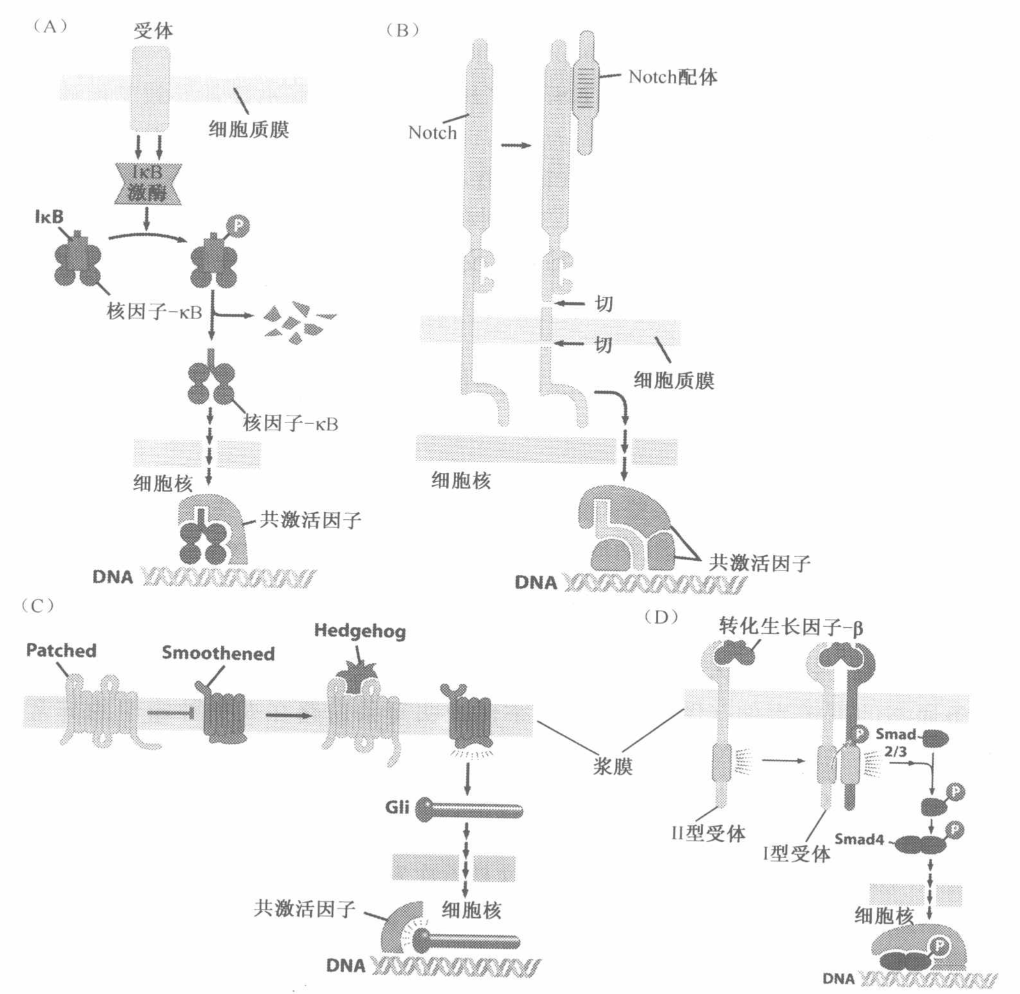


图 6.29 四种双重定位信号通路 (A) NF-κB 家族转录因子(蓝色)以异源二聚体形式存在,被 IκB 扣押在细胞浆中。多种受体和传入的信号可以激活 IKK,IKK 磷酸化 IκB,使得 IκB 被标记后走向蛋白降解。NF-κB 从 IκB 释放后转位到细胞核中,在那里活化一大批的基因,其中包括有抗凋亡和促进细胞分裂的基因(未显示)。(B) 细胞表面的 Notch 受体可以结合配体 NotchL、Delta 和 Jagged。与配体的结合导致 Notch 蛋白被切割,释放出 Notch 的细胞内片段,转位到细胞核中,作为转录因子复合物的一部分发挥作用。(C) Hedgehog 与 Patched 受体结合促使 Patched 释放出 Smoothened。Smoothened 一旦被释放,就可以阻止 Gli 蛋白被切割,完整的 Gli 蛋白转位到细胞核中,辅助形成具有功能的转录因子。(D) TGF-β 结合到到 II 型 TGF-β 受体,将 I 型和到 II 型 TGF-β 受体结合在一起,导致 I 型受体的磷酸化而活化。活化的 I 型受体磷酸化细胞浆中的 Smad2 或 Smad3 蛋白,其中的一种磷酸化的 Smad 与 Smad4 结合。最后这种异源二聚体的 Smad 复合物转位到细胞核中,在那里与其他转录因子形成复合物,驱动基因的表达。

NF-κB 信号转导通路中的成员在人类恶性肿瘤中极少发现有突变现象,这条通路通常呈现组成性的活化状态。例如在乳腺癌中,NF-κB 通路经常处于高度活化状态,

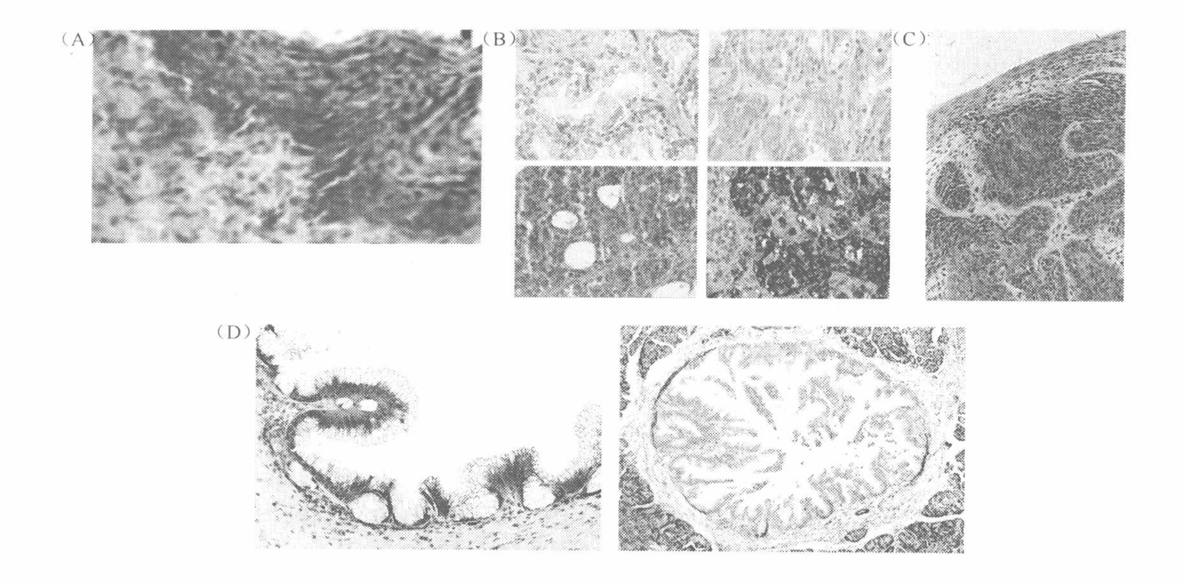


图 6.30　人类肿瘤中双重定位信号通路的异常　（A）NF-κB 通路。磷酸化形式的 IκB 免疫染色（棕色）显示人宫颈癌多阶段发展的早期就有 NF-κB 通路的局部活化。本例标本为低度鳞状上皮内瘤变。（B）Notch 信号通路。Notch 通路异常经常是由于 Notch 配体的过表达。在前列腺癌中，Notch 的配体之一 Jagged 呈现过表达现象。上面一行为正常前列腺和原发癌的免疫染色（从左到右），下面一行分别为没有接受过抗雄性激素治疗的转移癌和已经对激素治疗耐受的转移癌（从左到右）。原发癌中 Jagged 过表达与转移性复发密切相关。（C）Hedgehog 通路。这条通路在大多数的皮肤基底细胞癌（BCC）中异常。主要表现在 BCC 中 Gli1 蛋白浓度的升高。免疫染色（棕色）显示，在正常细胞中 Gli1 很难检测到。Northern（RNA）杂交分析显示 BCC 比正常皮肤细胞中 Gli1 的 mRNA 水平高出多达 40 倍。（D）TGF-β 通路。这条通路在多数肿瘤中通过多种机制失活。在胰腺癌的进展过程中，低度恶性的皮内瘤（PanlN-1）经常表达 Smad4，TGF-β 信号通路的关键转录因子。但是高度恶性的 PanlN-3 损伤则经常缺失 Smad4，原因主要是编码基因的突变。（A，from A. Nair et al.，Oncogene 22：50-58，2003；B，from S. Santagata et al.，Cancer Res. 64：6854-6857，2004；C，from L. Ghali et al.，J. Invest. Dermatol. 113：595-599，1999；D，from R. E. Wilentz et al.，Cancer Res. 60：2002-2006，2000.）

尽管活化的具体分子机制尚不清楚。NF-κB 还在多种淋巴来源的恶性肿瘤发生中发挥重要作用：REL 基因，编码 NF-κB 的一个亚基，在大约 1/4 的弥漫性大细胞淋巴瘤中明显扩增，导致其基因产物的表达增加了 4～35 倍；在 B 细胞淋巴瘤，T 细胞淋巴瘤和骨髓瘤中，经常发现涉及 NF-κB 基因座的基因转位现象；另外，这条通路的失调现象在低恶性的癌前病变已经可以出现（图 6.30A）。

Notch　这条通路由 Notch 蛋白调控。关于这条通路的研究可以追溯到 1919 年，人们发现了果蝇的一个等位基因，这个基因可以引起果蝇翅膀边缘形成凹口。几十年后，人们又发现 Notch 是一个跨膜蛋白，并在哺乳动物中发现了四种不同的 Notch 蛋白（四种不同基因的产物）。如前面章节所讲，Notch 是一个细胞表面受体，当与配体结合

后经历两次蛋白酶切，一次在细胞外，另一次在细胞跨膜区，后一次的酶切释放出一个从细胞膜到末端的大的胞浆蛋白片段，这个片段随后移动到细胞核中，与其伴侣蛋白一起作为转录因子发挥作用（图 6.29B）。

这条信号通路运转的生化机制与酪氨酸激酶受体完全不同。每次 Notch 受体结合配体后，受体将经历一次不可逆转的共价改变，更明确地说就是蛋白酶切。因此，受体的活化数量与结合的细胞外配体直接相关，每一个 Notch 受体在结合配体后仅仅活化一次。而与之形成鲜明对比的酪氨酸激酶受体则可以在结合受体后的相当长时间里释放出多个信号，将生长因子配体所启动的信号大大增强。

Notch 蛋白的胞内区截段作为强有力的癌基因在体外实验中可以转化细胞。这一现象提示结构被改变的 Notch 在人类肿瘤的发生发展中发挥作用。事实上，在大部分的宫颈癌、一部分大肠癌和肺鳞癌中都发现了 Notch 蛋白的过表达现象。这种过表达经常会伴随 Notch 细胞内截段定位于细胞核内的现象，提示在肿瘤细胞中这条通路处于活化状态。另外，在一些宫颈癌和前列腺癌中也发现了 Notch 的两个配体 Jagged 和 Delta 的过表达现象。更引人注目的是，在大约 10%的急性淋巴细胞白血病（ALL）发现了 Notch 的组成性活化状态，究其原因是由于编码 Notch-1 蛋白细胞外区的 *NOTCH-1* 基因发生了基因缺失。一些实验还发现 Notch 信号通路在癌基因 *ras* 转化过程中发挥重要作用。

Patched 以前我们已经提到，当 Patched 受体与其配体 Hedgehog 结合时，Patched 可以去除对于 Smoothened 蛋白的抑制作用，Smoothened 随后激活下游的信号转导通路，经过一系列尚不清楚的改变后，活化的 Smoothened 蛋白可以改变胞浆中 Gli 蛋白的命运。正常状态下，在缺少 Smoothened 蛋白调节时，Gli 前体蛋白被切割为两个片段，其中一段移动到细胞核中，在那里行使转录抑制子的功能。但是，当 Smoothened 被活化时，Gli 前体的切割被抑制，导致完整的 Gli 蛋白移动到细胞核中，作为转录激活子发挥功能（图 6.29C）。

Gli 最初是在恶性胶质瘤中发现的一个高表达蛋白（命名由来）。一旦高表达，Gli 和几个关系亲近的家族蛋白可以发挥癌基因的功能。随后的研究也发现了该通路异常参与肿瘤发展的其他例证。例如，人 patched 基因（*PTCH*）遗传性失活突变会导致 Gorlin综合征，一种遗传性的肿瘤易感综合征，这种病表现为皮肤多发性基底细胞癌及其他肿瘤的发病危险性增加，尤其是成神经管细胞瘤——一种小脑细胞肿瘤。这一类的失活性突变导致 Patched 不能抑制 Smoothened，使得下游不间断地释放活化的 Gli 蛋白到细胞核中。

大约有 40%的散发性皮肤基底细胞癌（体细胞突变而非遗传性突变）携带有 *PTCH*或者 *SMO*（编码 Smoothened）等位基因的突变，这种基底细胞癌在西方人种中非常常见，庆幸的是通常都是良性的（图 6.30C）。在其他肿瘤中也发现了 *PTCH* 等位基因的体细胞突变，包括成神经管细胞瘤、脑膜瘤以及乳腺和食管癌等。这些突变，与遗传性突变相似，可以中和 Patched 的功能，再一次允许 Smoothened 组成性地活化 Gli 转录因子。最近，在成神经管细胞瘤中也发现了这条通路中另外一个由 *SUFU* 基因编码的下游成员的突变。而且，目前已经明确至少存在三个 Gli 蛋白，其中两个激活转录，另一个则抑制转录。

由于突变造成 Patched 信号通路的成员结构改变的肿瘤，仅仅占有这条信号通路过度活化的人类肿瘤中的一小部分。事实上，一项涉及食管癌、胃癌、胆管癌、胰腺癌等细胞株及肿瘤的研究显示，所有这些 Patched 受体及其配体（不论 Sonic Hedgehog 还是 Indian Hedgehog）表达水平的异常都标志着一个自分泌信号环路的运转，这个观点已经通过本条活化通路中的下游产物 Gli 因子在细胞核中的累积而验证。而且，利用抗 Hedgehog 的抗体（可以中和两种类型的配体，打破信号环路）处理肿瘤细胞可以引起肿瘤细胞的增殖停止并发生死亡。在小细胞肺癌——吸烟者常见恶性肿瘤中，也报道有相同的发现。综上所述，这些报道都证明了该信号通路在多种起源于胚肠的组织发生的肿瘤中具有重要作用。

TGF-β 第四条可以将细胞浆蛋白调度到细胞核中的信号通路由 TGF-β 受体引领。TGF-β 和它所引起的信号转导通路在几乎所有的肿瘤发生中发挥重要作用，包括早期 TGF-β 在多种细胞类型中阻滞细胞生长及稍后的肿瘤进展期影响肿瘤侵袭表型。我们将在稍后的 8.10 节和第 14 章具体讨论这条重要的信号通路。这条通路的活化可以将转录因子 Smad 调度到细胞核中，在那里和其他核转录因子合作激活一大批基因的表达（图 6.29D），在关键因子 Smad 缺席时，上皮性肿瘤细胞可以逃脱 TGF-β 的生长抑制作用而茁壮生长，这种状况在侵袭性胰腺癌的前体细胞中经常可以看到（图 6.30D）。

6.13 总结与展望

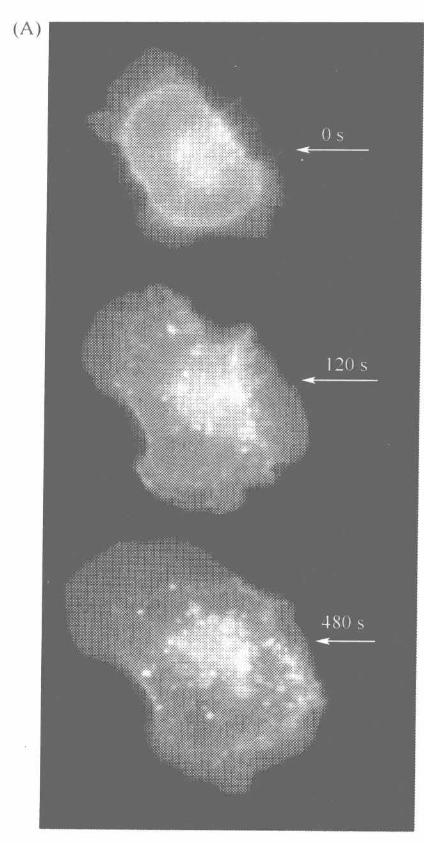
肿瘤细胞中的信号转导 肿瘤细胞的一个重要特点就是可以内源性地生成自身有丝分裂信号。这些信号使得肿瘤细胞可以从对于外界有丝分裂信号的依赖性中解放出来，尤其是那些由生长因子传递的信号。对于人类肿瘤发生最重要的有丝分裂通路可能就是我们已经详细讨论过的如下图所示的通路：

GF→RTK→Grb2→Sos→Ras→Raf→MEK→ERK

如上一章和本章所述，有多种分子机制导致肿瘤细胞中这条信号通路的上游部分持续活化。肿瘤细胞可能获得了合成和释放某些启动自分泌信号环路的生长因子的能力。或者，生长因子受体（RTK）发生了重大的结构改变。以 EGF 受体为例，在某些肿瘤，如恶性胶质瘤中，胞外区的缺失导致胞内酪氨酸激酶可以不依赖配体而活化。

在肿瘤中更为常见的是野生型的受体表达水平提高，如 EGF 受体及其家族成员 ErbB2/HER2/Neu。很明显，这些由乳腺、脑、胃肿瘤细胞所表达的受体分子的高表达，可以引起细胞增殖加速。这些受体的过表达往往是由于编码受体的基因的扩增或者基因转录水平的失调造成的。

经由 RTK → Ras → Raf → MAPK 信号通路引发的信号同时也被试图削弱信号的负反馈机制调节。例如，当 EGF-R 与配体结合时，受体-配体复合物通过细胞胞吞作用被内吞到细胞内（图 6.31）。这时，受体可能被转运到溶酶体降解，也有可能重新循环到细胞膜表面。当受体的内吞机制出现故障时，受体在细胞表面过量积聚，进而造成有丝分裂信号被增强。EGF-R 以及其他 RTK 的内吞作用发生故障可能在多种肿瘤细胞的增殖过程发挥至关重要的作用。



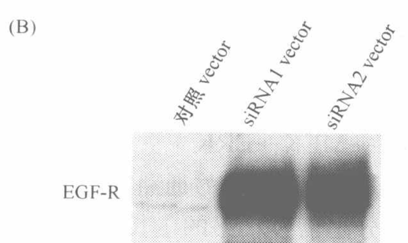


图 6.31 受体信号的负反馈调节 细胞有丝分裂信号被负反馈环路减弱，保证细胞获得生理需要的合适剂量的信号。(A) 大部分的负反馈环路很难在显微镜下看到，如下看到的例外。利用微量加液器（位置见箭头所示）在培养液中加入表皮生长因子（EGF），使得细胞暴露在 EGF 中，EGF 起初引起细胞表面 EGF 受体（在这里标记荧光染料）释放细胞分裂信号到细胞中。但是，在 120s 内，在细胞面向 EGF 的一面，发荧光的 EGF-R 被内化；再过 480s，细胞的所有表面都发现了受体的内化簇。因此，受体不能在细胞表面与配体结合，则 EGF 信号被关闭。(B) 细胞周期蛋白 G 相关的激酶对于受体表达的负反馈调控，可以通过以下实验来显示，细胞周期蛋白 G 相关的激酶（GAK）的表达可以被两个干扰 RNA（RNAi）抑制。细胞中，EGF 受体的正常表达水平，作为 immunoblot 的标准参照（左泳道）。任意一个 RNAi 表达时，EGF 受体的表达量上调约 50 倍。（右侧两个泳道）GAK 促进 EGFR 及其他细胞表面蛋白内化的机制尚不清楚。(A, from M. Bailly et al., Mol. Biol. Cell 11：3873-3883，2000；B，adapted from L. Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101：10296-10301，2004.）

我们注意到，受体下传的有丝分裂信号通路中，Ras 蛋白的上游信号转换蛋白，在人类肿瘤中未见有报道存在突变。前面讲过 *ras* 基因的编码区第 12、13、61 位密码子的点突变导致 Ras 癌蛋白的活化，这些突变蛋白可以长时间的处于活化状态，而不像正常癌蛋白 Ras 受到严格调控短时间活化。这些点突变造成的氨基酸置换（在超过 1/5 的人类肿瘤中发现）使得癌蛋白 Ras 可以抵抗 GTP 酶活化蛋白（GAP）的作用，GTP 酶活化蛋白（GAP）在通常状态下可以激活 Ras 的 GTP 酶活性。在下一章我们将会谈到神经纤维瘤病中某个灭活 Ras 的 GAP 在某些细胞中缺失，导致过量 GTP 结合形式的活化状态 Ras 蛋白的过度聚集。

继续顺着这条通路向 Ras 下游寻找，我们又找到了一个在人类肿瘤中相对少见的突变蛋白——B-Raf 蛋白。B-Raf 蛋白与 RAF 激酶具有较近的同源关系，是这个标准的一个例外。仅在我们研究的大约 8％的人类肿瘤细胞株中发现了其突变形

式。另外，大约有 2/3 的黑色素瘤具有 *BRAF* 基因的点突变。*BRAF* 的正常翻译产物与 Raf 一样需要 Ras 的激活才可以活化，而突变形式的 B-Raf 蛋白对于 Ras 的依赖性则大大降低。

另一个例外就是磷脂酰肌醇（-3）激酶（PI3K），PI3K 也是在 Ras 的直接下游起作用。前面讲过 PI3K 可以被 Ras 或生长因子活化，或者二者同时活化，其产物是磷脂酰肌醇（PIP3）。在某些卵巢和大肠肿瘤，PI3K 的一个亚基可能呈突变形式，但更为常见的是抑制这条通路的信号有缺陷：在正常状态下，PIP3 的水平被 PTEN 磷酸酶所抑制，而在某些类型的肿瘤中 PTEN 经常发生缺失。事实上，PTEN 缺失引起的 PIP3 水平上调与由 Ras 癌蛋白诱导的 PI3K 的过度活化具有同样效果。PIP3 水平上调导致 Akt/PKB 的活化，进而对细胞生存、生长和增殖广泛产生影响。

已有的资料表明，从生长因子通过 Ras 到达 ERK 的信号转导通路是在造血细胞外的大部分人体细胞中起支配作用的有丝分裂信号通路，这条通路在肿瘤中频繁发生失调控状态也反应了其重要性。另外还有其他的候选信号通路在附近随时待命。未来的研究将会揭示其他信号通路的作用，如在本章提到的信号通路（包括 GPCR、Patched、Notch 和 NF-κB）作为主导性信号通路，在某些常见的肿瘤中提供驱动细胞增殖的有丝分裂信号，与RTK→ Ras 信号通路一争高下。但令人感兴趣的是，在常见的雌激素受体阳性乳腺癌中起主要作用的有丝分裂信号通路仍然知之甚少（信息栏 6.5）。

信息栏 6.5　乳腺癌有丝分裂的秘密。 乳腺癌是西方常见的恶性肿瘤，并且已经进行了广泛的研究，但是，对于这类肿瘤的生长调控分子水平的理解仍然很模糊。大多数乳腺癌表达雌激素受体（ER），这类受体与我们已经讲到的其他受体的作用机制有很大不同。其作用机制与其他核受体一样，ER 结合其配体雌激素（更精确地说是雌二醇），随后结合到某些靶基因启动子区的特异性 DNA 序列；这种结合，与转录共调节因子联合，启动这些基因的转录。

雌激素在 ER 阳性的乳腺癌细胞中是非常重要的分裂原。一些对抗雌激素的因素如 tamoxifen 可以结合到 ER，阻断其转录激活能力，阻止 ER 阳性细胞和肿瘤的生长，并且引起肿瘤的缩小。这些可以证明雌激素的重要作用。但是，这些都不能完全解释雌激素和 ER 是如何驱动 ER 阳性的乳腺癌细胞增殖的。当雌激素加入到细胞的几分钟时间内，Ras → MAPK 信号级联即被活化。这种快速反应利用 ER 作为核转录因子发挥作用似乎无法解释，因为核基因转录改变在半小时之内是无法体现在细胞质中的（以新形成的 mRNA 模板引起的蛋白质合成）。

另一条重要线索来自于配体活化的 ER 分子被束缚在细胞膜上而不是位于通常所在的细胞核中。当结合配体后，某些细胞浆中的 ER 可以与 Shc 结合。Shc 是重要的含有 SH2、SH3 结构域的桥连蛋白，参与 Sos 的活化和 Ras 信号通路。虽然目前知之甚少，但是 ER-Shc 的连接，或许可以解释雌激素是如何激活细胞质内的分裂信号级联的。目前关于乳腺癌的研究已经远比其他类型的肿瘤研究更为透彻，而对于这么重要的分裂信号还仍不能描述清楚，真是意料之外的事情。

有丝分裂信号通路的组织管理　回顾人类肿瘤中有丝分裂信号通路异常的详细资料，我们可以为关于这些信号通路的组织情况及其如何影响肿瘤的发病过程勾勒出一个大致的轮廓。进化创造了像我们一样的多细胞生物体，利用很少的细胞信号通路（甚至一条）来调节不同组织中单个细胞的增殖。完全不同的设计计划被恰如其分地粘贴在一起：我们的每一个细胞都利用某些独特的信号通路来调控自身的增殖（这其中的一条，涉及酪氨酸激酶受体，发挥最重要的作用）。

在每一类型的细胞中，信号转导通路以组合方式来工作，在组织发育过程中，成体组织的保养与修护过程中，确保增殖发生在恰当的地方和恰当的时间。而且，不同类型的细胞利用不同的信号通路组合来调节细胞的生长和分裂。这可以帮助我们解释在本章中讲到的肿瘤发生的生化机制为什么那么复杂。

信号转导的生化机制围绕少量的基本原则和大量特殊的细节来组织，这是一个由多种信号通路组成的复合体。其中的很多细节是6亿到7亿年前多细胞生物进化过程中解决其生物或细胞生理问题的解决方案；更有许多解决方案可以追溯到10亿年前的真核生物起源。一旦整合在一起，这些解决方案就变得稳固且相对不变，除非有其他机制的存在，否则随后信号通路的发展都将建立在此基础上。（自然，这些解决方案的最终产物——对于正常发育和一生健康最优化的机制通常可以完美运转。在人的一生中，身体内部的细胞需要经过大概 10^{16} 个生长-分裂周期，来保证我们大部分人认为理所应当的极好健康状态。）

本章描述的信号环路大部分都在细胞浆中运行，它们通过细胞表面受体，接受来自细胞外的信号，包括可溶性配体——特别是生长因子，或者不溶性的胞外基质成分（如整联蛋白）。接受到这些受体传入的复杂信号后，细胞质的信号环路再为细胞质和细胞核中的靶分子传递信号。

细胞质中的靶点包括调节细胞形态和运动、能量代谢、蛋白质合成、凋亡机制等决定细胞生死的调控蛋白等。其传出的信号转导到细胞核中，在那里调节数千个基因的转录，这些基因参与细胞凋亡和分化以及细胞周期运行等生命活动。以后我们将再次讲到这些主题。细胞周期的调节和分化将在第8章讲述；细胞程序性死亡-细胞凋亡将在第9章讲述；细胞运动调节将在第14章讲述。

在本章讲到了很多重要的主题，最主要的是在正常和肿瘤细胞中信号转导的三条通路。首先，信号分子的内在活性可以调节。这种调节可以通过非共价修饰（如Ras结合GTP），或者受体的二聚体，或者共价修饰来实现。如MEK被Raf磷酸化，PIP2被PI3K磷酸化，Notch被蛋白切割就是三种实例。第二，信号分子的浓度可以被调节，通常是数量变化。如β-catenin的浓度可以被GSK-3β磷酸化下调，而PIP3的浓度被PI3K（正向）和PTEN（反向）同时调节。第三，信号分子在细胞内的定位可以被调节，造成其从非活化位置移动到发挥功能的新位置。最生动的例子就是酪氨酸激酶受体（RTK）的磷酸化及后来的吸引多种含有SH2区域的分子到磷酸化的酪氨酸部位。这些信号转导分子一旦锚定到受体，就被带到细胞膜上其他分子附近，如Ras（被带到Sos）和PIP2（被带到PI3K）。

细胞质分子转位到细胞核是第三类调节机制的另一种体现。例如，在本章中我们讲到了一类独特的蛋白，称为“双重定位”转录因子，它们在胞浆中以非活化形式存在，而以活化转录因子形式（或其组成成分）释放到细胞核中。如β-catenin、NF-κB、Smads、Notch、Gli和STAT等。

信号在细胞内从一个位置转换到另一个位置的动力学是多种多样的。快速反应机制涉及激酶的级联反应。位于这条级联反应底部的细胞质MAP激酶（MAPK），包括Erk，在细胞受到分裂原刺激后迅速活化（时间小于1min），并快速移动到细胞核中，在那里被磷酸化后激活一系列关键的转录因子。稍慢但是非常高效的信号转导

通路，则是以上提到的通过激活细胞质静止信号转录因子并将其以活化形式释放到胞核中。到目前为止，最慢的信号转导机制依赖于信号蛋白浓度的调节。这种模式主要是通过改变基因的转录速度、mRNA 翻译、mRNA 的稳定或者翻译后蛋白产物的稳定性来调节。

本章讲到的信号转导通路在我们整个身体的不同种类细胞中似乎以同样的方式组织在一起，这对于我们理解肿瘤的发生和发展具有重要的提示意义。更明确地说，我们在研究某一类型的细胞恶性转化过程中得到的生化经验经常被证实也适用于身体中的其他细胞类型。而日益丰富的人类肿瘤基因异常的数据也强烈支持这一论点。

不同细胞类型中相同的细胞生长调节通路促使我们思考，为什么不同类型的细胞对于细胞外信号的反应如此不同。多数答案最后都归于每一类细胞表面受体类型的不同。原则上，利用细胞表面受体的细胞类型特异性表达及其细胞内部信号通路的不同组合，我们可以预测不同类型细胞对于外界不同分裂原和生长抑制因子（如 TGF-β）的不同反应。同样，根据我们对于肿瘤细胞基因组中共存的突变等位基因排列的理解，我们可以预测这些等位基因如何影响细胞生物学行为以及如何共谋完成细胞的恶性表型。但是在实际中，我们要想做到这一步还很难，原因至少有如下几点：

1. 在本章中，我们仅仅描述了这些通路运转的大致轮廓，并且有意识地避开了很多细节。但是这些细节是必不可少的。例如，这些信号通路的某些步骤经常会同时被多个，具有相同功能的，差别细微的信号蛋白调控。如共有四种结构的 Ras 蛋白、三种结构的 Akt/PKB、Raf 及其同源性相近蛋白 B-Raf。在大多数情况下，我们忽略了在一条通路中表面上看起来相同的蛋白功能上的差别，使得我们对于这条通路如何作为一个整体来运行的理解不够全面。

2. 在每一条通路中，复杂的正/负反馈环路可以增强或者削弱信号强度。我们只是简单地提到了这一点，但是目前已知的反馈环路只是冰山一角。例如，在人类基因组中已经发现了超过 100 个编码磷酸酪氨酸磷酸酶（PTP）的基因，它们负责去除存在于细胞中的 90 个酪氨酸激酶（TK）所结合的磷酸基，但是我们对于这些重要酶类的调节以及其底物却知之甚少。

3. 信号通路中的每一个成员作为一个复杂的信号处理装置，在向下游传递之前，都可以放大、削弱或者整合这些来自于通路上游的信号。我们还没有一个定量的方法来理解特定信号转换蛋白是如何处理信号的。

4. 蛋白互相传递信号的能力还受到细胞内蛋白浓度、翻译后修饰（如磷酸化）、细胞内定位等因素的影响。我们才刚刚开始研究到这个复杂问题。

5. 考虑到信号在细胞中播散的时间，高效而快速信号转导可能只能发生在相互作用的蛋白共定位于同一个细胞内时，而我们对于蛋白在细胞内定位以及其相互作用的蛋白伴侣了解很少。

6. 细胞内没有一条信号通路是单独运行的，相反，每一条通路都会与其他通路相互联系而受到影响，其中一些我们在本章已经提到。可以理解，对于这些通路间相互作用的研究只能推迟到每一条通路的运转机制被阐明后。一旦这些相互作用被加入到这些原来的信号通路图谱上，那么信号通路就会形成一个网状结构（图 6.32）而不是一系

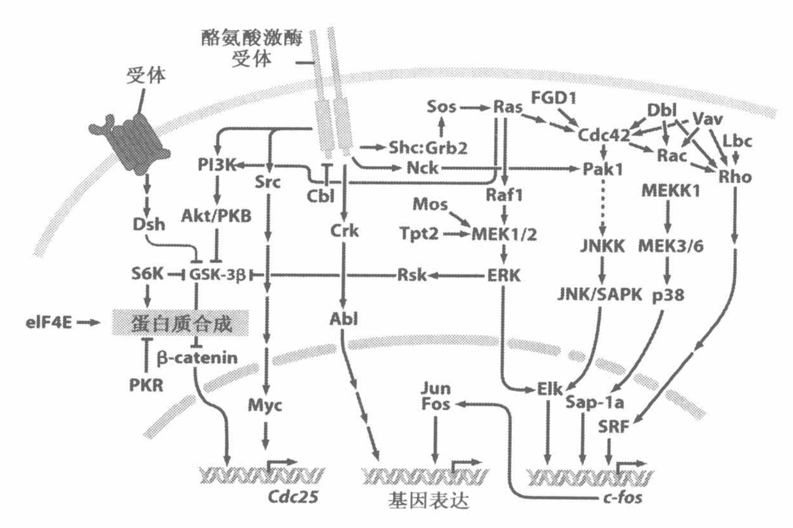


图 6.32　二维信号通路图　我们已经描述了从细胞膜到细胞核的线性信号级联，途中偶尔有分叉点。最近的研究揭示这些信号通路通过众多的交叉连接和汇聚点而发生相互作用。本简化图给出了一些关于交叉连接的提示。注意，以 GSK-3β 为例，GSK-3β 在 Wnt-β-catenin 通路中发挥核心作用，但是也同时被酪氨酸激酶受体下游信号蛋白所调节。(Adapted from T. Hunter, Cell 88：333-346，1997.)

列平行的通路，从细胞膜开始一直直线延伸到细胞核中。

7. 即使不存在这些复杂的相互联系，这些信号的最终表现——细胞表型的特定表现也是多条的，汇聚的信号通路组合作用的结果。这些复杂性又一次困扰了我们。

8. 关于信号是如何在细胞中传递的描述可能从根本上就是有缺陷的。我们又一次在这里讲起，强有力的信号搏动沿着信号转导通路下传，引起强烈的意义分明的细胞反应。事实上，每一个信号级联都像在一个美妙和谐的动态平衡中运转，正向和反向调节因子在这里得到平衡。因此，输入信号（如有丝分裂刺激）的运行就如同牵动蜘蛛网上的一根纤维，通过这个网对于远端仅仅产生轻微的反应。在这里，任何语言和数学描述都不足以阐明我们对于信号通路的理解。

许多肿瘤研究者都希望能够画一张完整而精确的细胞线条图——一张描写细胞通路是如何相互作用的图解。勾画这些环路中的节点和连线的困难之一就来自于基因组中众多种类的基因。举一个例子，大约有 518 个不同的基因编码种类繁多的蛋白激酶，这其中有 40%存在不同剪切类型的 mRNA，编码结构稍异的激酶蛋白，从而使得细胞中可能存在超过 1000 种不同的激酶蛋白。在 518 个基因中，90 个编码酪氨酸激酶，其余的编码丝/苏氨酸激酶。在 90 个酪氨酸激酶中，有 58 个为生长因子受体信号域，这些激酶大多参与细胞增殖和生存的调节过程。从这些数据就可以看到肿瘤发病过程中信号环路的复杂性。

关于 Ras 信号通路生物化学的研究也可以说明信号通路的复杂性。在本章中，我们重点介绍了 Ras 对下游三条重要信号通路中的作用，特别是 Raf、PI3 激酶（PI3K）和 Ral-GEF（有时称 Ral-GDS），参见 6.5 节、6.6 节和 6.7 节。Ras 蛋白参与多种生化途径，因此就会形成如图 6.33 所示的信号通路模式。

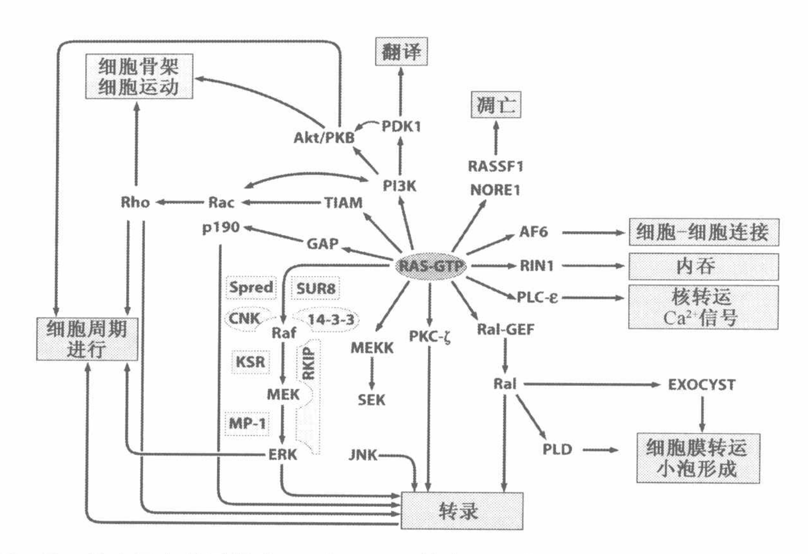


图 6.33 Ras 效应蛋白信号通路 对于 GTP 结合，活化形式的 Ras 蛋白生化特性的详细分析显示，除 Raf、Ral-GEF 和 PI3 激酶（PI3K）这三条主要的效应信号之外，Ras 蛋白还可以结合到更多的效应分子。如图所示，至少已经发现了另外 8 个 Ras 相互作用蛋白，其中大部分已经知道或者是预测在传递 Ras 信号到特定下游信号通路过程中发挥重要作用，这些信号通路涉及转录、膜转运、细胞内化和翻译等多种功能。(Adapted from M. Malumbres and M. Barbacid, Nat. Rev. Cancer 3：459-465，2003.)

结构生物学的发展已经很成熟，在此基础上分析蛋白分子的精细结构，包括在肿瘤发展过程中的信号转换分子的精细结构已经成为常规。结构决定其功能，因此，阐明这些蛋白的结构可以大大丰富我们对于信号通路运转方式的理解。关于蛋白质结构的目录还远没有完善，但是这种状况在快速改变，在将来，如图 6.34 所示的详细结构信息将对于我们理解信号环路的运转产生巨大影响。

由于我们无法解释信号转导通路如何决定细胞的生物学行为，因此，我们也无法理解另一个难题，那就是肿瘤细胞基因组遗传学：为什么很多类型的人类肿瘤表现出高度特异的基因改变？为什么 90%的胰腺癌携带突变的癌基因 K-*ras*，而在乳腺癌细胞中这种突变仅仅不足 10%？为什么 EGF 受体和其同一家族成员 HER2/erbB2 的扩增可以在超过 1/3 的乳腺癌中同时发现，而在其他种类的上皮性肿瘤中却很少见到，虽然这些受体在很多种类的上皮细胞中都广泛表达？

为什么大约有 50%的结肠癌携带突变的 K- *ras* 基因，余下 50%的肿瘤又是如何获得相似的有丝分裂信号的呢？这些肿瘤有一些携带突变的 B-Raf 或者 PI3K，但是，还有很多肿瘤在 Ras → Raf → MAPK 信号级联和平行的 PI3K → Akt/PKB 信号通路中均没发现明显的基因改变。那么这些肿瘤是否携带我们尚未发现的激活其中某条通路的基因改变吗？还是，这些肿瘤细胞可以利用某种与这些特定通路无关的机制来自主增殖呢？为什么在肿瘤细胞中会发现某些特定突变或改变的基因联合出现，而其他类型的联合却没有被发现呢？

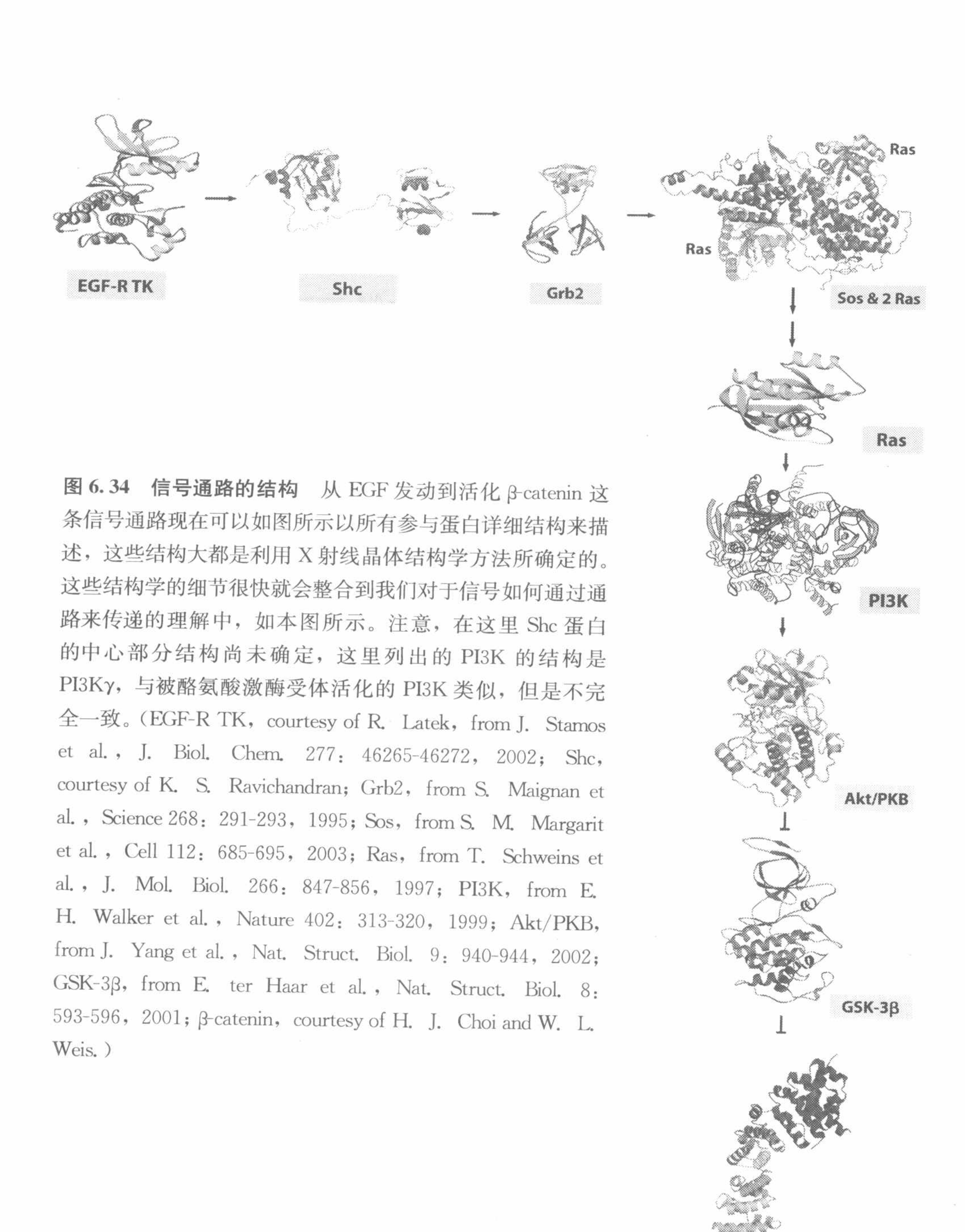


图 6.34　信号通路的结构　从 EGF 发动到活化 β-catenin 这条信号通路现在可以如图所示以所有参与蛋白详细结构来描述，这些结构大都是利用 X 射线晶体结构学方法所确定的。这些结构学的细节很快就会整合到我们对于信号如何通过通路来传递的理解中，如本图所示。注意，在这里 Shc 蛋白的中心部分结构尚未确定，这里列出的 PI3K 的结构是 PI3Kγ，与被酪氨酸激酶受体活化的 PI3K 类似，但是不完全一致。（EGF-R TK，courtesy of R. Latek，from J. Stamos et al.，J. Biol. Chem. 277：46265-46272，2002；Shc，courtesy of K. S. Ravichandran；Grb2，from S. Maignan et al.，Science 268：291-293，1995；Sos，from S. M. Margarit et al.，Cell 112：685-695，2003；Ras，from T. Schweins et al.，J. Mol. Biol. 266：847-856，1997；PI3K，from E. H. Walker et al.，Nature 402：313-320，1999；Akt/PKB，from J. Yang et al.，Nat. Struct. Biol. 9：940-944，2002；GSK-3β，from E. ter Haar et al.，Nat. Struct. Biol. 8：593-596，2001；β-catenin，courtesy of H. J. Choi and W. L. Weis.）

最后，还有一个临床肿瘤学上最重要的问题没有答案：为什么细胞中某些突变等位基因或者蛋白表达谱的联合可以预测患者预后的好坏？目前，我们的研究大都局限在寻找表达模式和临床结果之间的相关性，但是这些相关性很难揭示肿瘤细胞的基因组学与这些细胞引起的肿瘤生物学行为之间的因果关系。这些问题以及相关未知机理的最终解答还尚待时日。

重要概念

- Src 含有三个同源结构域：SH1 具有酶的功能；SH2 作为细胞内的“感受器”结合特定的磷酸化的酪氨酸，其特异性由其 C′端的特殊寡肽序列所决定；SH3 识别并结合含有脯氨酸富集结构域的底物。
- 作为配体诱导的交互磷酸化，酪氨酸激酶受体的胞内尾巴区就像一个磷酸化的酪氨酸矩阵的展示区。每一个磷酸化的酪氨酸吸引并且结合一个特定的含有 SH2 序列的胞浆蛋白。这种对于含有 SH2 结构域蛋白的束缚使得它们可以与膜上结合的蛋白以及磷脂发生相互作用，并产生多种生物化学信号，传递到下游不同的信号转导级联中。
- Sos 通过鸟嘌呤核苷酸交换因子（GEF）影响 Ras 蛋白，它可以促使 Ras 将 GDP 转换为 GTP 进而活化。两个连接蛋白，Shc 和 Grb2，在酪氨酸磷酸化的受体和 Sos 之间形成一个物理连接桥梁，将 Sos 带到恰当的位置与 Ras 蛋白相互作用，Ras 蛋白通常都结合在细胞膜的内表面。
- 活化的 Ras 蛋白通过其效应环与下游的分子伴侣相结合，激发三条主要的下游信号级联，这些信号伴侣包括：Raf 激酶、磷脂酰肌醇（-3）激酶（PI3K）和 Ral-GEF。
- Raf 磷酸化 MEK 的残基，导致 MEK 活化，并活化细胞外信号调节激酶 1 和 2（Erk 1 和 2），Erk 1 和 2 再磷酸化其下游底物。Erk 1 和 2 属于促分裂原活化蛋白激酶（MAPK），因此这条信号级联经常被称为 MAPK 通路。
- 磷脂酰肌醇（-3）激酶（PI3K）信号通路依赖于磷脂的磷酸化，这条通路对于抑制细胞凋亡以及促进细胞生长（细胞体积）是非常重要的。PI3K 磷酸化膜上的磷脂，将其转换为 PIP3。Akt/PKB 通过其普列克底物同源物（PH）被吸引到 PIP3，并被磷酸化，进而活化一系列刺激细胞生长和增殖以及抑制细胞凋亡的蛋白分子。PIP3 通常受到磷酸酶的作用，如 PTEN，在细胞内保持低水平。这提示这条通路在肿瘤细胞中的异常可以有两种情况——PI3K 的过度活化或者 PTEN 的失活。
- 细胞质中利用 PH 结构域与 PIP3 相结合的蛋白是一类 GEF，它们的作用与 Sos 相似，可以活化不同的 GTPase，属于 Rho 家族的三个小 G 蛋白 Rho、Rac 和 Cdc42。活化的 Rho 蛋白参与细胞骨架的重建以及细胞与周围环境的黏附作用。
- 在第三条 Ras 调节的信号通路中，Ras 与 Ral 直接的联系是通过 Ral-GEF 来介导的。与活化的 Ras 蛋白结合后，Ral-GEF 定位于细胞膜的表面，发生了构象改变，诱导 Ral 释放出 GDP 并结合 GTP。Ral 接着活化下游的靶分子（如 Cdc42、Rac）。
- 细胞因子受体缺少共价结合的酪氨酸激酶区域，而是与 Jak 类的酪氨酸激酶形成复合物，并磷酸化 STAT（信号转导子及转录激活子）。STAT 形成二聚体，迁移到细胞核中，在那里作为细胞生长和存活类基因的转录因子发挥作用。
- 当酪氨酸激酶受体结合生长因子，而整联蛋白则结合细胞外基质（ECM）的成分，将引起成簇黏附并引起成簇黏附激酶（FAK）的活化。FAK 是一类与整联蛋白胞浆尾部结合的非受体性酪氨酸激酶。FAK 磷酸化的酪氨酸残基为 Src 提供了停靠位点，Src 可以磷酸化更多的 FAK 的酪氨酸，为其他含有 SH2 结构域的分子提供停靠位点，并可

以活化下游靶基因，包括 Ras 和 PI3K。

- Wnt 调控的信号通路可以使得细胞停滞在相对未分化状态——这是肿瘤细胞的一个重要特征。通过 Frizzled 受体，Wnt 抑制糖原合成酶激酶-3β（GSK-3β）的活性，而活化的 GSK-3β 可以磷酸化其关键的下游底物，包括 β-catenin 和 cyclin D1，使得它们被降解。多余的 β-catenin 可以移动到细胞核中，与 Tcf/Lef 蛋白结合后活化关键的生长刺激基因的转录。
- 与细胞外配体结合后，G 蛋白偶联受体活化细胞质异源三聚体 G 蛋白，其 α 亚基将 GDP 变换为 GTP。Gα 亚基与它的两个伴侣分离，然后激活或者抑制细胞质中具有促进或者抑制细胞分裂的酶类（如 Src、腺苷酸环化酶、磷脂酶 C），而 Gβ + Gγ 二聚体则活化自己的效应蛋白，包括 PI3Kγ、PLC-β、Src、Rho-GEF。
- 核因子-κB（NF-κB）信号系统依赖于 NF-κB 在细胞质中形成同源和异源二聚体。NF-κB 抑制因子（IκB）通常情况下会将 NF-κB 扣留在细胞质中，但是当接收到信号时，IκB 就被 IκB 激酶（IKK）标记上降解的标签而降解，使得 NF-κB 被释放并移入到细胞核中，在那里激活至少 150 个基因的表达。其中某些基因编码重要的抗凋亡蛋白。NF-κB 可以通过诱导 *myc* 和 cyclin D1 基因的表达而行使促进细胞分裂的功能。
- 与配体结合后，Notch 经历两次切割，释放一个细胞质内片段，移动到细胞核中，作为转录因子复合物的组分发挥作用。活化受体的解体意味着 Notch 与 RTK 不同，Notch 在与配体分子结合后只能活化一次。
- Patched 受体与配体 Hedgehog 结合，导致 Patched 释放 Smoothened 蛋白，Smoothened 蛋白激活下游信号保护细胞内 Gli 蛋白不被切割。这样完整的 Gli 移动到细胞核中，作为转录激活因子发挥作用，反之被切割的 Gli 会产生片段，作为转录抑制子起作用。
- TGF-β 信号通路使得细胞质中的 Smad 转录因子释放到细胞核中，在那里辅助激活一大堆基因的活化。这条通路在许多癌症的发病过程中发挥重要作用，在早期阶段 TGF-β 抑制细胞增殖，晚期促进肿瘤细胞的侵袭。
- 以上描述的信号通路以一种组合的方式进行运转，保证增殖发生在发育过程中恰当的地方和恰当的时间；不同类型的细胞使用信号通路的不同组合来调节其生长和分裂。
- 总之，信号以如下方式通过信号通路进行传递：①通过非共价修饰（如 Ras 结合 GTP），受体二聚化，或共价修饰（Raf 磷酸化 MEK）调节信号分子自身活性；②调节信号分子的浓度（如 PI3K 上调 PIP3 的浓度而 PTEN 下调其浓度）；③调节信号分子在细胞内的定位（如磷酸化的 RTK 吸引含 SH2 的分子；细胞质中的分子转位到细胞核中）。

思考问题

1. 细胞通过什么样的分子机制来保证信号沿着一条信号级联下传，到达特定的终点靶分子，而不是无目的地播散到细胞质中的“随意”靶分子？
2. 你可以列出几种导致原癌基因转换为活化癌基因的分子机制？

3. 为什么癌基因 *ras* 的点突变非常精细地局限在某些核苷酸，而其他肿瘤相关蛋白的点突变一般都广泛分布在编码这些蛋白的可读框？
4. 决定癌基因 *ras* 活化状态寿命的因素是什么？
5. 利用蛋白酶处理细胞，蛋白酶切割 E-cadherin 的细胞外部分经常会导致基因表达的快速改变，根据对该蛋白的了解，该如何解释这些反应呢？
6. 是什么机制确保生长因子受体发起的信号在细胞质中沿着信号级联传递的过程中被大大增强？相反，又是哪一个信号级联强烈抑制从细胞表面发动的信号扩增的？
7. 我们需要确定什么样的定量参数来描述特定的信号传递蛋白，才能够在这些信号蛋白形成信号级联行为之前利用数学模型来预测？

参考读物

Alonso A, Sasin J, Bottini N et al. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699–711.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD & Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.

Blume-Jensen P & Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365.

Bourne HR, Sanders DA & McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125–132.

Bowman T, Garcia J, Turkson J & Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474–2488.

Brazil DP & Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26, 657–664.

Buettner R, Mora LB & Jove R (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.* 8, 945–954.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL et al. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395–1413.

Caron E (2003) Rac signaling: a radical view. *Nat. Cell Biol.* 5,185–187.

Chang L & Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.

Cohen P and Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 769–775.

Dale TC (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329, 209–223.

Derynck R & Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signaling. *Nature* 425, 577–584.

Gilman A. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615–649.

Hazzalin CA & Mahadevan LC (2002) MAPK-regulated transcription: a continuously variable switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 30–40.

Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225–236.

Hunter T (1997) Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333–346.

Hunter T (2000) Signaling—2000 and beyond. *Cell* 100, 113–127.

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.

Kadesch T (2004) Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 506–512.

Karin M, Cao Y, Greten FR & Li Z-W (2002) NF-κB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301–310.

Levy DE & Darnell JE Jr (2002) STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–662.

Lewis TS, Shapiro PS & Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. In Advances in Cancer Research (GF Vande Woude, G Klein eds), pp 49–139. San Diego: Academic Press.

Lowy DR & Willumsen BM (1993) Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851–891.

Malumbres M & Barbacid M (2003) *RAS* oncogenes: the first thirty years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.

Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298,1912–1934.

Marinissen MJ & Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 368–376.

McCormick F (1999) Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 9, M53–M56.

McManus EJ & Alessi DR (2002) Tsc1-Tsc2: a complex tale of PKB-mediated S6K activation. *Nat. Cell Biol.* 4, E214–E216.

Miele L & Osborne B (1999) Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J. Cell Physiol.* 181, 393–409.

Mumm JS & Kopan R (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151–165.

Nelson WJ & Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.

Neves SR, Ram PT & Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296, 1636–1639.

Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191–203.

Pawson T & Nash P (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445–452.

Pawson T & Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* 278, 2075–2079.

Perkins ND (2004) NF-κB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* 14, 64–69.

Polakis P (1999) The oncogenic activation of β-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 15–21.

Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837–1851.

Reuther GW & Der CJ (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 157–165.

Richmond A. (2002) NF-κB, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 664–674.

Scheid MP & Woodgett JR (2001) PKB/Akt: functional insights from genetic models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 760–767.

Schlaepfer DD & Hunter T (1998). Integrin signalling and tyrosine

phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8, 151–157.

Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225.

Seto ES & Bellen HJ (2004) The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol.* 14, 45–53.

Shamji AF, Nghiem P & Schreiber SL (2003) Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol. Cell* 12, 271–280.

Shi Y & Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.

Shields JM, Pruitt K, McFall A et al. (2000) Understanding Ras: "it ain't over 'til it's over." *Trends Cell Biol.* 10, 147–154.

Smalley MJ & Dale TC (1999) Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 215–230.

Taipale J & Beachy PA (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349–354.

Vivanco I & Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.

Vogt PK (2001) PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol. Med.* 7, 482–484.

Weng AP & Aster JC (2004) Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 48–54.

Wicking C & McGlinn E (2001) The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett.* 173, 1–7.

Yaffe MB (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 177–186.

Yaffe MB & Elia AEH (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 131–138.

Yarden Y & Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Cancer* 2, 127–137.

Yu H & Jove R (2004) The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4, 97–105.

（徐宁志　张　薇　何　顺　朱红霞）

第 7 章　抑癌基因

让我加一点——肿瘤的遗传。肿瘤可能是这样产生的，两条染色体的同源部分必须以同样的方式被削弱。

Theodor Boveri，*病理学家*，1914 年

原癌基因和癌基因的发现为细胞增殖的驱动机制提供了简单而有力的解释。原癌基因编码的蛋白通过多种途径参与接收和加工细胞外环境来源的生长刺激信号。一旦这类基因发生突变，其释放的生长刺激信号则处于失控状态。癌蛋白失去原有的精细调控，开始源源不断地释放生长刺激信号，导致肿瘤细胞的不可控生长。

精心设计的可控系统在逻辑上意味着促进这一过程的成分必然被另外一些与此过程相反的成分所中和平衡。生物学系统也遵循这一定律，由此可知，迄今为止我们讨论的这些生长促进基因只是细胞生长控制过程的一部分。

20 世纪 70 年代和 80 年代早期，与癌基因的已知性质难以相符的一些肿瘤细胞遗传学实验证据逐渐增多，这暗示着另一类功能不同的细胞生长控制基因的存在——限制或抑制细胞增殖。这类抗生长基因被称为肿瘤抑制基因，这类基因失活或丢失时参与肿瘤形成。一旦细胞丢失这类基因中的某一个，细胞将摆脱其生长抑制功能。现在，经过近 30 年时间，我们逐渐认识到**肿瘤抑制基因**的失活在肿瘤发病过程中与肿瘤癌基因的激活起着同样重要的作用。实际上，在许多人类肿瘤细胞的形成过程中这些基因在细胞基因组的丢失可能比癌基因的激活更为重要一些。

7.1　细胞融合实验显示肿瘤表型是隐性的

20 世纪 70 年代的肿瘤病毒研究发现这些感染因素携带大量致癌基因，尤其是病毒癌基因。当病毒基因组被转入正常细胞，这些基因将起决定性作用。一种肿瘤病毒基因组转入正常细胞会引起这个细胞的转化。这种反应意味着，尽管感染细胞内保证细胞正常增殖的细胞内基因仍然存在并表达，病毒癌基因会支配细胞行为。因为病毒癌基因会使这些细胞基因失效，根据定义，这些病毒基因能够导致显性表型——引起细胞转化。这提示肿瘤性细胞的生长与正常（野生型）细胞生长相比是显性表型，因此可以认为正常细胞的生长是隐性的（见 1.1 节）。

然而，病毒所致的细胞转化方面的研究未能精确模拟大多数人类肿瘤形成相关的遗传机制。就像那时人们所怀疑的，在 20 世纪 80 年代得到实验支持的一样，大多数人类肿瘤并不是肿瘤病毒感染的结果。在许多人心中，人类肿瘤遗传学的根本性问题并未解决。因此，如果人类肿瘤并不是由肿瘤病毒引起的，则这些肿瘤病毒研究的结果与了解人类肿瘤的发生无本质相关。在这种情况下，我们需要摒弃所有关于肿瘤起源的偏见，承认肿瘤细胞表型是显性或隐性特性的概率是相等的。

对于肿瘤导致的隐性等位基因重要性的线索最初来源于英国牛津大学的实验。只有

当一对等位基因共存于同一细胞或器官时，对于两个可选等位基因的有意义的差别和特定表型才会出现。根据孟德尔遗传学，当显性等位基因与隐性等位基因共同存在时，根据定义所表示的，显性等位基因胜出，细胞呈现显性等位基因所表达的表型。

细胞融合技术非常适合于将正常生长的等位基因和导致恶性增殖的等位基因造成一种面对面的状态。在这一实验过程中，将两种不同表型的细胞（经常是不同基因型）在同一培养皿中培养（图 7.1）。然后用一种试剂引起单层细胞中相邻细胞的细胞膜发生融合。融合试剂通常是化学试剂（如聚乙二醇）或病毒糖蛋白（如类似仙台病毒的副黏病毒表面的病毒糖蛋白）。只要两个细胞相互靠近且其细胞膜相互接触，融合试剂会产生一个拥有同一个细胞膜的双细胞核大细胞，常称之为**合体细胞**（图 7.2）。如果大量单层细胞相互之间碰巧非常接近，经融合试剂处理后，所有的细胞膜可能融合形成单一的合体细胞——一个拥有巨大细胞膜的**多核细胞**。

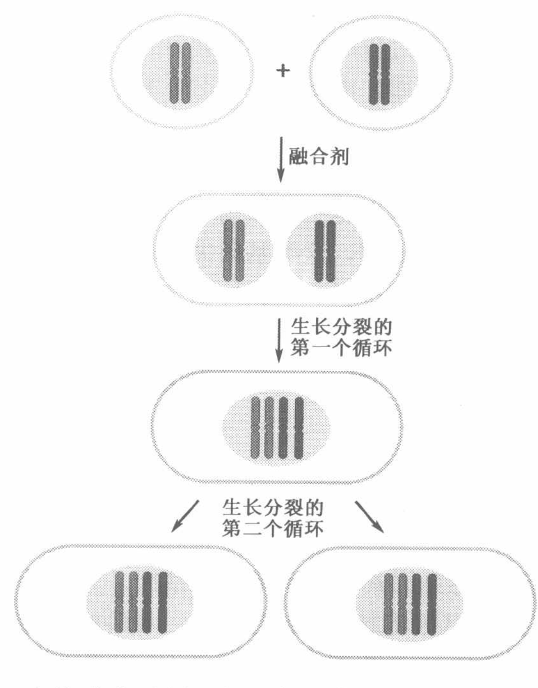


图 7.1 细胞的实验性融合 用融合试剂，如失活的仙台病毒或聚乙二醇(PEG)，处理单层培养的细胞，邻近生长的细胞形成多核的异核体。如图两个邻近细胞形成的一个双核细胞。当这个细胞生长至有丝分裂期时，两对亲代染色体进入一个细胞核形成四倍体细胞。经过繁殖，后代细胞经常丢失一些染色体片段，形成三倍体或超二倍体细胞。

这些融合试剂不加选择地作用于细胞，两个相同的细胞或两种不同类型的细胞都可能发生融合。如果两种不同来源的细胞发生融合，形成的杂交细胞被称为**异核体**，显示其包含两种遗传学不同的细胞核。通过遗传学方法可以筛选携带两种遗传学不同的细胞核的融合细胞，同时消除无法融合或携带两个相同细胞核的细胞。例如，每种细胞可能携带一种遗传学标志，使其对原来敏感的抗生素产生抗性。在这类试验中，两种细胞混合并用融合试剂处理后，同时暴露于两种抗生素，只有异核体细胞可以存活。

携带大量细胞核的细胞通常无法存活，而双核细胞通常可以存活并继续生长。当进入有丝分裂期，两个核膜破裂，两对染色体进入有丝分裂期，最终产生的每个子代细胞会接受一个单独的细胞核，而这个细胞核含有来源于两个母体细胞来源的染色体。我们可以设想将一个肿瘤细胞与野生型细胞融合成异核体细胞，在这个异核体细胞内，两组基因共存于同一基因组（图 7.3），因此来源于一个母体细胞的突变的致瘤基因与来源

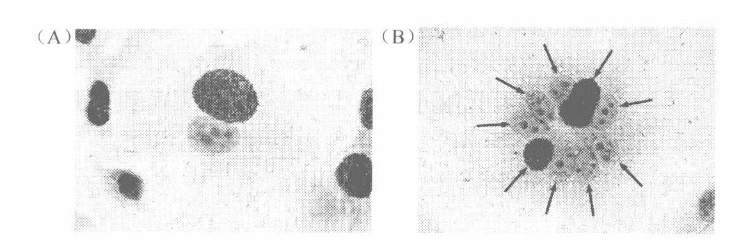


图 7.2　实验性融合细胞的出现　如图所示为最初用融合试剂培养得到的融合细胞产物（图 7.1 为失活的仙台病毒）。用选择培养基和标志基因能够保证存活的双核或多核细胞携带母代细胞来源的细胞核。相反，用这些标志基因能够保证消除只携带一种母体细胞来源的融合细胞。如果这个杂交细胞是可以存活的，互补的染色体在以后的有丝分裂中融合成单个的细胞核。（A）如图，放射性标记的小鼠 NIH 3T3 细胞与猴肾细胞融合，产生双核细胞。较大的小鼠细胞核通过放射性自显影被银粒子识别。（B）在同样的融合条件下，多核体以相同或更高的效率形成，但通常无法增殖和产卵。这个多核体含有 9 个细胞核（箭头所示）。（Courtesy of S. Rozenblatt.）

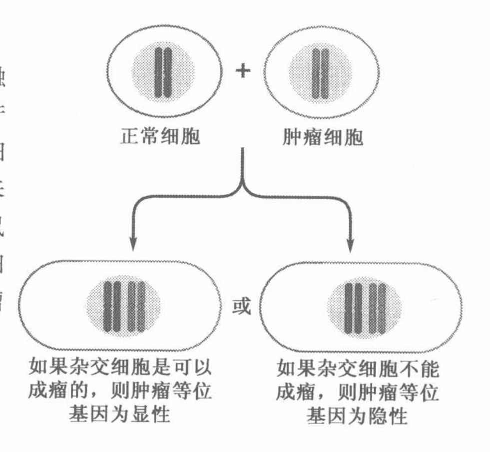


图 7.3　肿瘤遗传表型的显性和隐性　应用细胞融合技术检验肿瘤细胞表型的显性或隐性，理论上产生两种结果：致瘤的杂合细胞和非致瘤的杂合细胞。实际上，当融合实验所用的肿瘤细胞大部分来源于非病毒导致的人类肿瘤（或化学物质诱导的鼠肿瘤），杂合细胞是非致瘤性的。相反，当肿瘤细胞来源于病毒所致肿瘤时，杂合细胞一般是致瘤性的。

于另一个母体细胞的野生型等位基因（控制正常细胞增殖）直接遭遇。

一些杂交细胞完全接受了来源于两个母体细胞的基因组，形成四倍体细胞。这些细胞携带的染色体数目远远多于其生长和存活所需的染色体数，因此在以后的培养繁殖过程中，会逐步丢掉一部分染色体，逐渐形成亚四倍体甚至三倍体细胞。有时候，来源于一个母体细胞的染色体会被优先清除。例如，将人类细胞和小鼠细胞融合，后代杂交细胞会逐渐清除人类细胞染色体，最后只有很少一部分染色体来源于人类基因组。

利用细胞融合技术可以获得来源于完全不同组织的杂交细胞，甚至可以获得人-鸡杂交细胞。将 G_1 期细胞与 M 期细胞融合，观察哪个细胞周期起决定性作用，未分化细胞与分化细胞融合确定哪种细胞表型起决定性作用。然而，我们只关注一种实验类型的结果：正常细胞与肿瘤细胞的杂交细胞如何生长?

当时人们赌注肿瘤是一个潜在的显性表型，当与正常细胞生长表型在一起时也是显性的（图 7.3）。然而在这种情况下，一般来说，赌注是错的。大量实验表明，当肿瘤细胞与正常细胞融合，将产生的四倍体细胞或同时产生的亚四倍体杂交细胞注射入合适的宿主动物体内，发现这些细胞已经失去了肿瘤形成能力。这个出乎意料的结果说明恶

性细胞表型相对于正常野生型生长来说是隐性的。

通过肿瘤病毒感染得到的转化细胞与正常细胞进行杂交在这些实验中是一个典型的特例。在这种情况下，通过特定病毒癌基因得到的肿瘤细胞表型在肿瘤-正常细胞杂交细胞中呈显性。因此肿瘤与正常细胞表型的理论得到了补充和完善：如果肿瘤细胞不是肿瘤病毒参与产生时，与正常细胞融合后，其恶性表型是隐性的。

7.2 肿瘤细胞隐性表型特性的遗传学解释

实际上可以通过一个简单的遗传学模型来解释这些现象。这基于一个遗传学常见现象：一个突变失活的等位基因在一个完整的野生型等位基因存在时是呈隐性的。

我们可以这样假设：正常细胞携带可以限制或抑制其增殖的基因。在肿瘤发展过程中，不断发展的肿瘤细胞丢失或使一个或多个这样的基因失活。一旦这些生长抑制基因丢失或失活，肿瘤细胞不再受这些生长抑制基因的抑制，增殖加速。只要这些基因丢失，肿瘤细胞继续恶性增殖。然而，肿瘤细胞与正常细胞融合后，这些完整的野生型生长抑制基因再一次在肿瘤细胞内发挥作用，使肿瘤细胞的增殖，至少是其肿瘤形成能力停止。

这些假设基因的野生型拮抗肿瘤细胞表型，因此称其为抑癌基因（TSG）。人们或支持或反对抑癌基因的存在，对此一直存在争议。支持这一观点的事实是，通过一系列突变使基因失活要比通过突变使其活性增加容易得多。例如，只有改变 *ras* 原癌基因的第 12 位、13 位和 61 位密码子的点突变可以使其高活化。恰恰相反，对于一个抑癌基因，或者对其他任何基因而言，其蛋白编码区域很多位点的点突变或随机缺失使这些序列中的核酸片段丢失都可以使蛋白失活。

哺乳动物细胞基因组染色体成对的性质为反对抑癌基因的存在提供了合理的依据。如果突变失活的抑癌基因等位基因能够促进肿瘤细胞的生长，而且这些等位基因是隐性的，那么一个等位基因失活对肿瘤细胞没有任何影响，因为隐性突变的等位基因与显性野生型的等位基因共存。所以只有肿瘤细胞中某特定抑癌基因的一对野生型等位基因都失活时，此细胞才能从基因的失活中受益。

在一段短时间内发生两次独立的遗传学改变几乎是不可能的。发生两次突变的概率比发生一次突变的可能性小得多，这样看来在肿瘤形成时间内要求抑癌基因完全失活几乎是不可能的。例如，单个基因克隆突变失活的概率是 10^{-6}/细胞代，两个基因克隆失活的就是 10^{-12}/细胞代——考虑到最初肿瘤细胞数目较少，肿瘤形成需要多个遗传学改变，以及在几十年之内突变细胞扩增成临床可见的肿瘤，这更加不可能了。

7.3 视网膜母细胞瘤解决了抑癌基因的遗传学困惑

细胞融合技术永远无法解决关于抑癌基因是否参与肿瘤形成过程的争论。首先，仅仅这个实验策略几乎无法找到和分离出用于研究或支持抑癌基因假说的特定基因。最终，对于一种罕见的儿童期眼部肿瘤（**视网膜母细胞瘤**）的研究为这个问题的解决提供了重要依据。

这种视网膜肿瘤来源于视细胞的前体细胞，一般每两万个儿童约有一个病例出现（图 7.4）。这些肿瘤在从出生到 6～8 岁的儿童中都有发生，在这个年龄段之后则很少

发生。这类肿瘤**症候群**（一系列临床特征）表现为两种形式。一些没有视网膜母细胞瘤家族史的孩子表现为单侧眼的单个肿瘤。如果通过放疗或手术将肿瘤从患眼清除，以后这个孩子不会有患视网膜母细胞瘤或其他部位肿瘤的危险。因为这个孩子没有这种肿瘤的家族患病史，被认为是这种疾病的一个**散发**病例（这种形式的视网膜母细胞瘤只影响一侧眼球，称为单侧视网膜母细胞瘤）。

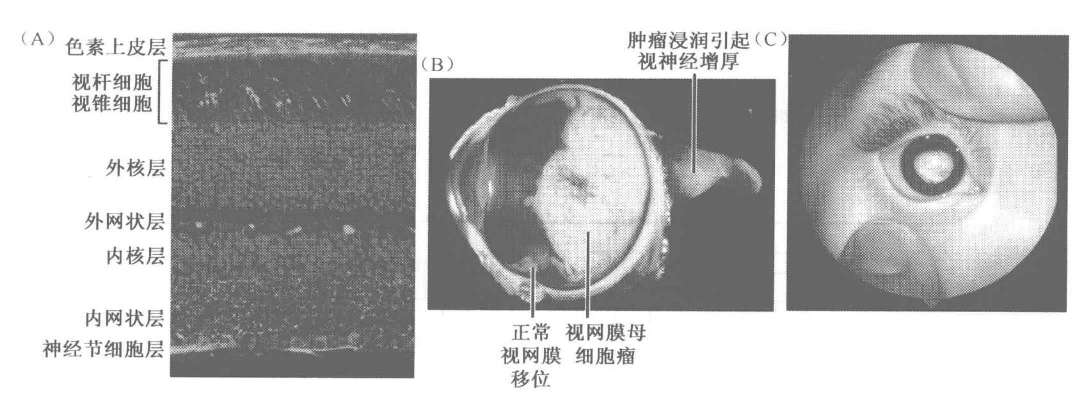


图 7.4 儿童视网膜母细胞瘤 由于未知的原因，尽管在人体大多数细胞类型中 *Rb* 基因在控制细胞增殖方面是有活性的，但 *Rb* 基因的缺陷倾向于在儿童视网膜这一小的高分化组织内形成肿瘤。(A) 肿瘤来源于包括视柱和视锥在内的多种视网膜细胞中的单分化干细胞前体。这一干细胞可能是所有这些细胞或其中某个亚型的前体细胞。这张显微照片显示了视网膜横切面，从眼球后部到眼球前部：色素上皮层、外核层、外网层、内核层、内网层和神经节细胞层（视柱和视锥细胞核位于外核层，光感受器向上延伸到色素上皮）。(B) 一个带有大的视网膜母细胞瘤的眼球。(C) 视网膜母细胞瘤在临床上最初通常表现为视网膜内出现混浊。(A，from S. W. Wang et al.，Development 129:467-477，2002；B，C，Courtesy of T. P. Dryja.)

患有**家族性**视网膜母细胞瘤的儿童，其父母有一方早期患过这种肿瘤并已治愈。在这种情况下，多在双眼出现多发肿瘤，因此被称为双侧视网膜母细胞瘤。这些儿童在青春期患骨肿瘤（骨肉瘤）的概率极高（比正常儿童高出 500 倍），在以后也有较高的可能性患其他部位肿瘤，而且在早期通过放疗或外科手术治愈视网膜母细胞瘤病不能降低这些肿瘤的发病率（图 7.5A）。患有这些肿瘤病存活下来并长大到成年期的患者通常具有生育能力，在他们的后代中，有一半的孩子将患有家族性视网膜母细胞瘤（图 7.5B）。

家族性视网膜母细胞瘤从母代到子代遗传的特性符合孟德尔显性等位基因的特性。实际上，没有家族史的孩子患视网膜母细胞瘤与家族性疾病几乎没有区别。在这些孩子体内，突变好像发生于精子或卵子形成期，导致这些孩子的所有细胞均携带这种癌性突变。这与那些父母一方基因组携带突变的等位基因，通过精子或卵子遗传给后代获得的病例具有相同的遗传学环境（大多数这样的突变来源于父系基因组，因为细胞生长和分裂的每一个周期都面临 DNA 复制错误的危险，从而导致突变，而精子形成与卵子形成相比需要更多的细胞周期）。

通过研究儿童患家族性或散发性视网膜母细胞瘤的动力学，Alfred Knudson 在 1971 年发现，家族性肿瘤的发病率与单个随机事件的发生一致，而散发性肿瘤的形成需要两个随机事件的发生（图 7.6）。

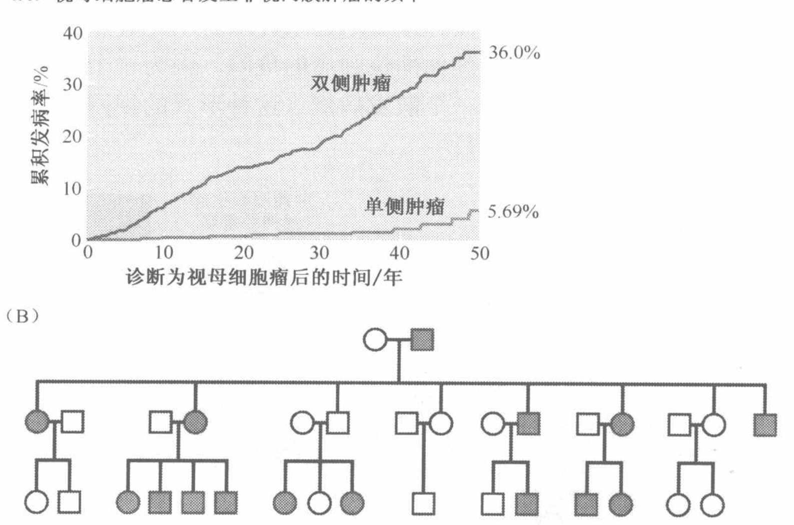


图 7.5　单侧与双侧视网膜母细胞瘤的比较　(A) 患有单侧视网膜母细胞瘤且父母双方均不是携带者的儿童，发病呈散发性。而患有双侧视网膜母细胞瘤的儿童，其发病呈家族性。如图所示，跟踪调查 1601 例在 1914～1984 年被诊断为视网膜母细胞瘤的临床病例。很明显，那些曾经患有双侧视网膜母细胞瘤并治愈的患者（红线所示），在多种组织再次患肿瘤的危险性远远高于曾经患有单侧视网膜母细胞瘤的患者（蓝线所示）（增加的危险性一部分来源于患者年轻时接受放疗，如 X 射线治疗，引起的眼周围组织肿瘤）。(B) 这个家谱显示了患有家族性视网膜母细胞瘤患者的多代亲属。视网膜母细胞瘤的患病率为 1/20 000。现代医药的出现使患有此病的儿童得以治愈并达到生育年龄，这种多代家谱在此之前是很少见的。男性（方形）、女性（圆圈）、患者（绿色圆圈、方形）、非患者（开放的圆圈、方形）。　(A，from R. A. Kleinerman，M. A. Tucker，R. E. Tarone et al.，J. Clin. Oncol. 23：2272-2279，2005；B，Courtesy of T. P Dryja.)

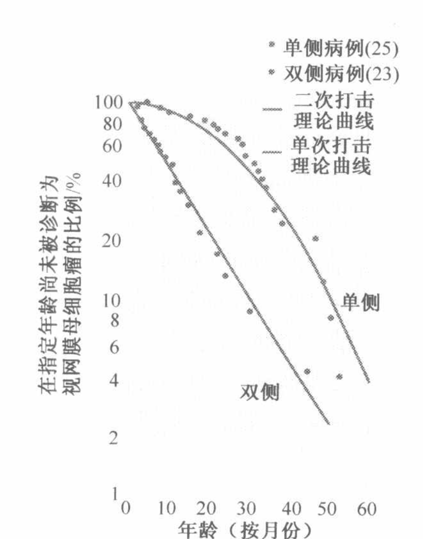


图 7.6　单侧和双侧视网膜母细胞瘤的发病动力学　Alfred Knudson 研究了单侧和双侧视网膜母细胞瘤在儿童中的发病动力学。他推测双侧病例（双眼患病）呈现单次打击动力学，而单侧肿瘤（仅影响单眼）呈现双次打击动力学。每一个打击代表一次体细胞突变。不久后发现这两次打击动力学与 *Rb* 基因两个拷贝有关。随年龄（按月份）显示（横坐标）未诊断病例的百分比（纵坐标）。　(From A. G. Knudson Jr.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68：820-823，1971.)

通过这些动力学分析，我们可以推断，假设存在一个 *Rb* 基因，其突变会导致儿童期视网膜母细胞瘤。我们假设在肿瘤发展过程中，*Rb* 基因突变总是产生失活的而且是隐性的 *Rb* 等位基因。如果具有致瘤倾向的 *Rb* 等位基因确实是隐性的，那么需要两个 *Rb* 等位基因都被敲除才会使视网膜细胞发生不可控增殖，产生视网膜母细胞瘤(图 7.7)。

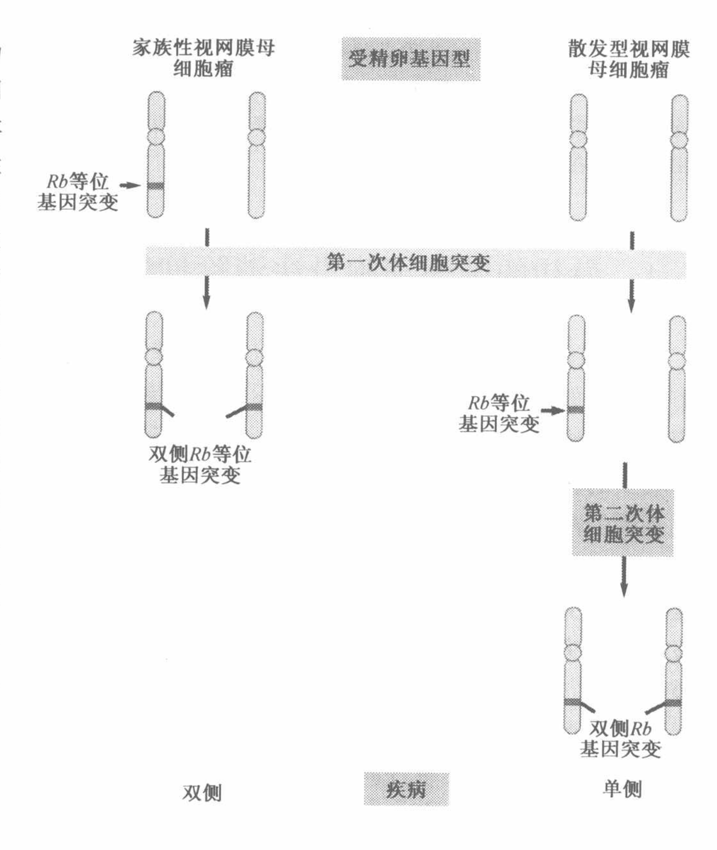


图 7.7 视网膜母细胞瘤形成动力学 Knudson 预测的两个相关基因(见图 7.6)就是人类 13 号染色体的 *Rb* 基因的两个拷贝。在家族性视网膜母细胞瘤，孩子通过受精卵获得一个缺陷的 *Rb* 基因拷贝，这个孩子的所有视网膜细胞都仅携带一个完整的功能性 *Rb* 基因。如果一个视网膜细胞仅存的 *Rb* 基因因为体细胞突变而消失，细胞会失去所有 *Rb* 基因功能，并开始增殖成为大量肿瘤细胞。在散发性视网膜母细胞瘤中，受精卵中的 *Rb* 基因是野生型。在一个患有视网膜母细胞瘤孩子的视网膜中，需要两次连续的体细胞突变改变视网膜前体细胞携带的两个野生型 *Rb* 基因的拷贝，从而产生相同的结果，细胞开始增殖为一个肿瘤组织块。在家族性视网膜母细胞瘤中，仅需要一个体细胞突变来消除 *Rb* 基因的功能，累及双眼的多个细胞。然而在散发性视网膜母细胞瘤需要两个体细胞突变，较少影响一个细胞谱系，多为单个肿瘤。

从父母基因组获得遗传上野生型 *Rb* 基因的儿童，其视网膜母细胞瘤的形成，需要视网膜细胞内两个连续的遗传学改变，使原有的功能性 *Rb* 基因拷贝失活。这种遗传学改变属于体细胞突变（图 7.7）。在约半数患有家族性视网膜母细胞瘤家庭出生的孩子中，其患病的动力学是不同的。在这些孩子体内，通过受精卵从父母一方获得一个 *Rb* 等位基因的突变。突变的 *Rb* 基因存在于包括视网膜母细胞在内的胚胎中的所有细胞。任一视网膜细胞只需要一个体细胞突变使存在的野生型等位基因失活，这个细胞内不再有任何功能性的 *Rb* 基因，因此这个细胞能够继续发展成视网膜母细胞瘤。

值得注意的是，对 *Rb* 基因行为的描述与通过细胞融合实验结果推测存在的抑癌基因的性质几乎一致（信息栏 7.1）。然而，所有这些仍然只不过是一个诱人的假说，因为 *Rb* 基因尚未被克隆出来，而且没有任何可用的分子学证据显示 *Rb* 基因拷贝通过突

变失活。

信息栏 7.1　突变的 *Rb* 基因显性特征和隐性特征共存　本章没有列出关于 *Rb* 基因的分子学证据，对这一点的讨论涉及一个显而易见的固有争论。在器官水平，一个通过遗传获得了突变的缺陷性 *Rb* 基因的个体，在儿童时期的某个阶段无疑是要患视网膜母细胞瘤的。因此，致病的 *Rb* 等位基因在器官水平表现为显性。然而，如果我们研究个体内细胞中的突变的等位基因的行为特点，不难发现突变等位基因是隐性的，携带有一个突变型和一个野生型 *Rb* 基因拷贝的细胞行为正常。因此，突变的 *Rb* 等位基因在器官水平是显性的，在细胞水平是隐性的（一位坚持遗传学术语的严格适当应用的遗传学家会说：视网膜母细胞瘤的表型在器官水平是显性的，在细胞水平是隐性的。现在我们将这些都忽视）。

7.4　最初的肿瘤细胞设法消除抑癌基因的野生型拷贝

Rb 基因的发现强调了这一观点：这个基因的两个拷贝都要被消除。但又引起了一个问题：如前所述，连续两个突变发生的概率大约是 10^{-12}/细胞代，那么在散发性视网膜母细胞瘤形成过程中，如何清除一个抑癌基因的两个拷贝？考虑在生长中的视网膜相对较少的靶细胞数目（Knudson 猜测大约有 10^6 个细胞），通过两个连续的突变消除抑癌基因的两个拷贝几乎是不可能的。

一些遗传学家对这个问题提出了解决方法。假设两个 *Rb* 基因中第一个拷贝的失活是由某种类型的突变引起的，其发生频率与大多数突变事件相同，约为 10^{-6}/细胞代。发生这种突变的细胞成为一个杂合体构象，有一个野生型和一个缺陷性基因拷贝——也就是 $Rb^{+/-}$。因为突变的 *Rb* 等位基因在细胞水平是隐性的，因此这个杂合体细胞继续呈现野生型表型。然而，如果第二个完整的 *Rb* 基因拷贝通过某种独立于初次打击的机制，由于第二次突变事件而失活会怎样呢？在配对的同源染色体之间可能存在一些遗传物质的交换，其中一个带有野生型 *Rb* 等位基因，另一个携带已经突变的缺陷型等位基因。一般来说，染色体重组发生在减数分裂期间。如果重组发生在一个携带有野生型 *Rb* 等位基因的染色体臂和一个来源于配对染色体的携带有突变的 *Rb* 等位基因的染色体臂之间，将会怎样呢（图 7.8）？人们认为这种重组发生在活细胞增殖期，因此称之为**有丝分裂重组**，以区别于产生精子和卵子的减数分裂。

在这种重组方式中，携带野生型 *Rb* 等位基因的染色体臂可能被来源于配对的同源染色体中携带突变的等位基因的染色体臂代替。因为这种交换是基于染色体臂之间遗传信息的互换，参与这一过程的染色体保持全长，在显微镜下观察，与遗传交换前的染色体无法区别。然而在遗传和分子水平，经过这一重组事件的细胞中可能会有一个细胞从野生型 *Rb* 等位基因变成 $Rb^{-/-}$。重要的是，这种有丝分裂重组发生率为 10^{-5}～10^{-4}/细胞代。与上面提到的发生率为 10^{-6}/细胞代的突变失活相比，更容易使细胞失去野生型 *Rb* 基因拷贝。

在有丝分裂重组前，两个同源染色体（以 *Rb* 基因为例，人类的两个 13 号染色体）在很多小细节方面是不同的。毕竟，一个是父系来源，一个是母系来源，它们在很多遗传学位点是杂合的。然而，有丝分裂重组导致 *Rb* 位点形成纯合体（产生一个 $Rb^{-/-}$ 基

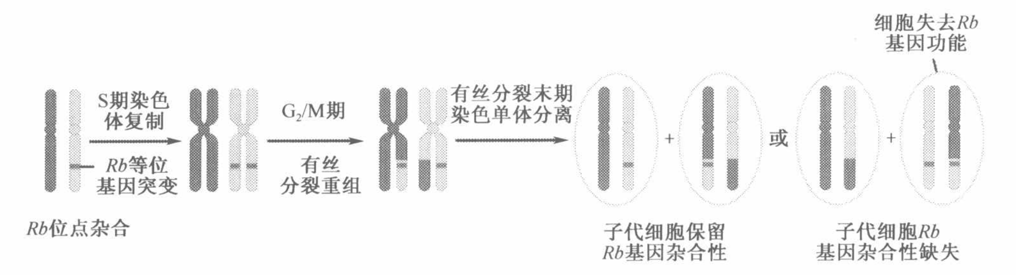


图 7.8 野生型 *Rb* 基因的消除 有丝分裂重组能够导致基因的杂合性缺失（LOH），如 *Rb* 基因。遗传物质通过遗传学交换过程在两个同源染色体（如两个 13 号染色体）之间发生交换，多发生在细胞周期的 G_2 期，或 M 期。遗传学交换发生后，接下来的染色质分离会产生在 *Rb* 位点保留杂合性的两个姐妹染色单体。这一过程以相同的概率产生两个姐妹细胞，这两个细胞在 *Rb* 位点发生杂合性缺失，其中一个是在 *Rb* 位点的同源性突变，另一个则是同源的野生型 *Rb* 基因。

因型或一个 $Rb^{+/+}$ 基因型），在 13 号染色体 *Rb* 位点附近的许多其他基因也会失去杂合性，而成为纯合体。这种一个染色体位点或一个基因的遗传学变化称为杂合性缺失，或简称为 LOH（一个替代词为“等位缺失”）。有趣的是，LOH 事件在不同人群的发生率也不同（信息栏 7.2）。

信息栏 7.2 近亲结婚导致较高的杂合性缺失？ 通过实验室和野生小鼠实验发现，如果同源染色体之间差异很大，与遗传学相似或完全相同的同源染色体相比，有丝分裂重组的概率会被抑制 10 倍甚至更多。这提示配对的同源染色体之间发生有丝分裂重组，依赖于两条 DNA 链之间核酸序列的相似程度。

这个发现对于人类肿瘤进展有重要的提示作用。在许多人类群体中，近亲结婚，甚至堂表亲之间结婚是很平常的。孟德尔遗传学提示在这些人的后代中，染色体区域纯合是很常见的。如果小鼠遗传学实验结果是有意义的，那这些个体中配对同源染色体之间更可能出现有丝分裂重组。如果两条染色体中的一条某个抑癌基因（如 *Rb*）发生突变，有丝分裂重组和杂合性缺失引起的该抑癌基因野生型拷贝的丢失将相应增加。因此，堂表亲结婚产生的后代更可能患肿瘤，仅仅因为他们的染色体更容易发生杂合性缺失。这个假设尚未验证。

染色体也可以通过其他方式实现杂合性缺失，其中一种是通过基因转换过程（图 7.9）。通过这种机制，在染色体 DNA 复制过程中延长的 DNA 链与第二条同源染色体中互补的 DNA 链形成杂合体。这条 DNA 链在与第二条染色体解螺旋以前，以第二条染色体为模板通过 DNA 合成酶延长，并且再次与合成起始的染色体互补链退火。其后，这条链将以它的起源链为模板继续延长。因此，新合成的 DNA 链需要配对染色体延伸出的 DNA 序列。如果这种基因转换涉及一条已经失活的 *Rb* 等位基因的拷贝，将再次发生杂合性缺失。这种基因改变在一代细胞中的发生频率要高于有丝分裂重组。

如上所述，通过任意机制发生的两个染色体之间的信息交换，可能涉及 *Rb* 位点两侧大量基因和遗传标志物，它们的行为正是我们所关心的。在信息交换前，我们可以设想 13 号染色体长臂上的许多基因和遗传序列也是杂合体（补充材料 1 ◉*）。然后这些

* 本书补充材料内容请见 http：//www. lifescience. com. cn。

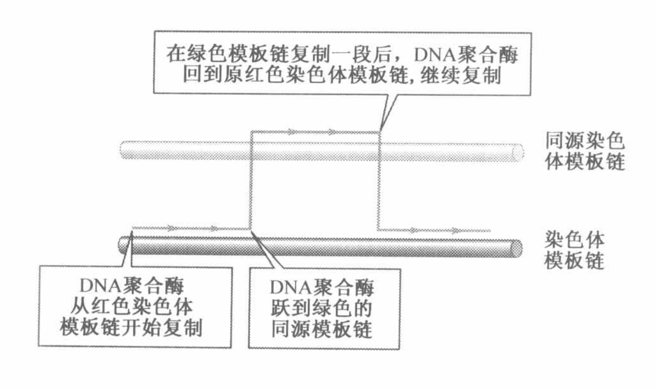


图 7.9 基因转换 在基因转换过程中，DNA 合成酶最初用染色体上的一条链（红色）作为模板，合成一个新的子代 DNA 链（蓝色）。沿模板链前进一段距离后，合成酶可能跳到同源染色体上继续复制，利用另一条染色体（绿色）的 DNA 链作为模板延伸子代 DNA 链。然后，合成酶可能跳回最初的 DNA 模板链继续复制。通过这种方式，一个突变的抑癌基因等位基因，如突变的 *Rb* 等位基因，可能从一条染色体转移到它的同源链，代替原本在这一位点的野生型等位基因。

基因和遗传序列也会发生杂合性缺失。

例如，*Rb* 位点由最初的 $Rb^{+/-}$ 变成 $Rb^{-/-}$ 或 $Rb^{+/+}$。同时，在染色体邻近区域的一个遗传学标志物序列从最初的 AAGCC/AAGTC（杂合子形式）变成现在的 AAGCC/AAGCC 或者 AAGTC/AAGTC（纯合子）。实际上，邻近的序列片段在两个同源染色体之间序列交换时也随着 *Rb* 基因一起发生了交换。

因为杂合性缺失与基因突变相比具有更高的发生概率，这也就是说与突变时间相比，第二个完整基因拷贝更可能通过杂合性缺失丢失。因此，预计大部分视网膜母细胞瘤的肿瘤细胞在 13 号染色体的 *Rb* 位点及其邻近的遗传学标志物呈杂合性缺失，只有一小部分肿瘤细胞携带通过独立的突变而失活的截然不同的两个突变的 *Rb* 等位基因。

7.5 肿瘤中 *Rb* 基因常发生杂合性缺失

1978 年，通过研究视网膜母细胞瘤细胞中的染色体推测 *Rb* 在染色体中的定位。在一小部分视网膜肿瘤中，通过有丝分裂中期染色体核型分析发现 13 号染色体长臂中的中间缺失。尽管这些缺失分别起始和终止于染色体臂的不同位点，它们实际上有一个共同点，即都引起 13 号染色体长臂 1 区四带染色体物质的丢失（图 7.10）。影响染色体带的中间缺失涉及几百甚至上千个碱基对，提示在视网膜肿瘤细胞发展过程中，这一区域的大量基因同时丢失。这些变化涉及遗传信息的丢失，为假想存在于这条染色体某个位点的 *Rb* 基因的丢失提供了证据——这正是根据抑癌基因理论获得的结果（在大多数视网膜母细胞瘤中，敲除 *Rb* 基因的突变影响很小一部分核酸序列，因此是**亚微观**的，即中期染色体在显微镜下是看不到的）。

幸运的是，在绘制 *Rb* 基因图谱的时候在 13q14 区域又发现了一个基因。这个基因编码酯酶 D，在人类基因中有两个完全不同的等位基因，其编码的蛋白在凝胶电泳中以不同的速率迁移（图 7.11）。酯酶 D 为遗传学家们提供了检测杂合性缺失的好机会。杂合性缺失发生时可以影响整条染色体区域。因此，既然酯酶 D 在 13 号染色体长臂上位于 *Rb* 基因很近的位点，如果 *Rb* 位点在肿瘤发展过程中发生了杂合性缺失，酯酶 D 位

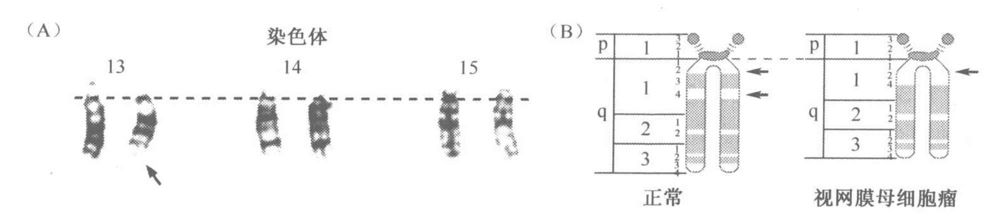


图 7.10 *Rb* 位点的染色体定位 （A）人类染色体上存在明显的深染带，这使得我们可以描述每一条染色体上的特定亚区（左）。这是一个 6 岁的视网膜母细胞瘤患者，认真研究肿瘤细胞的染色体核型，观察初期分裂细胞或中期细胞，发现存在一个缺失影响了 13 号染色体长臂，而 14、15 号染色体正常。(B) 通过认真的细胞遗传学分析发现缺失定位于 13q12 和 q14 之间，即在 13 号染色体长臂 1 区二带和四带之间。(A，from U. Francke，Cytogenet. Cell Genet. 16：131-134，1976.)

点一般会有相同的遭遇。因此，酯酶 D 位点可以作为尚未克隆出来的神秘的 *Rb* 基因的代理标志物。

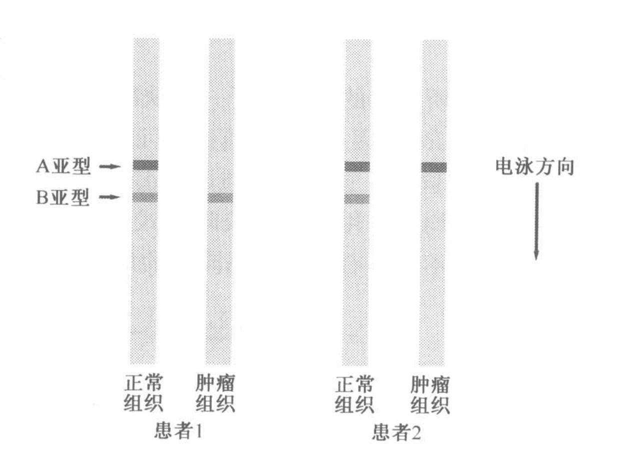


图 7.11 *Rb* 位点杂合性缺失的实证 图谱显示了凝胶电泳分离酯酶 D 的两个异构体。这些酶的存在可以通过一个生化反应显示出来，其产物在凝胶上呈一条带状。正常组织中存在这种酶的两个异构体形式，在凝胶上呈现两条带，而在视网膜母细胞瘤患者体内脂酶 D 位点为杂合性，在肿瘤组织这种酶只有一个形式，说明在肿瘤细胞内这一位点呈杂合性缺失。比较另一位视网膜母细胞瘤患者正常组织和肿瘤细胞内的酯酶 D，发现酯酶 D 在它的肿瘤细胞内呈杂合性缺失——由于此酶的另一异构体所在的特定染色体区域缺失所造成。(Adapted from R. S. Sparkes et al., Science 219：971-973，1983.)

确实，当研究人员仔细观察一些先天性酯酶 D 位点杂合的孩子的肿瘤细胞时，他们发现这些肿瘤细胞已经丢失一条酯酶 D 等位基因，因此一定已经经历了杂合性缺失（如图 7.11）。用多态性 DNA 序列标志物进行了一个相似的分析，得到了相同的结论——关于 *Rb* 基因的杂合性缺失。这些 1983 年的发现为这一观点提供了有力的证明：在肿瘤中邻近的 *Rb* 基因也经常发生杂合性缺失。因此它的行为符合理论上肿瘤抑制基因的行为：在细胞不可控生长前需要这一基因的两个拷贝均发生丢失。

注意杂合性缺失也可以通过整条基因链的断裂和丢失来获得，而不需要来源于另一条同源染色体上复制的拷贝来替代（如信息栏 7.3）。这导致此染色体区域呈半合子状态，这条染色体臂上的所有基因均为单拷贝，而不是常见的双拷贝。含有某些染色体区域的单拷贝基因，细胞可以存活，然而失去其他染色体区域的单拷贝基因则会使细胞处于非常不利的生物学状态。当染色体片段缺失（产生半合子），这称为杂合性缺失，因为在这条染色体区域只能检测到这个基因的一个等位基因，而之前存在两个明显的等位

基因。不管杂合性缺失是如何发生的，就肿瘤形成而言，其最终结果已经达到了——肿瘤抑制基因的野生型等位基因的缺失。

信息栏 7.3　杂合性缺失发生的其他机制　在许多肿瘤中，杂合性缺失是由于有丝分裂期间染色体的不合理分离引起整条染色体丢失造成的。剩下的一条携带突变等位基因的染色体，可能被复制而产生两条完全相同的染色体，所有基因均处于纯合状态。此外，通过仔细研究人类结肠癌细胞染色体成分发现，至少在这些肿瘤中，杂合性缺失一般通过改变染色体结构的遗传学改变获得，因此影响细胞的核型。许多这类事件看起来是转位，它们参与非同源染色体臂之间的重组。这样的重组是由于双链 DNA 断裂产生的末端与另一条染色体上的 DNA 序列融合引起的。这样，一些遗传区域复制的同时其他区域丢失。下面，我们将讨论在肿瘤发生过程中发生非同源重组事件的一种特殊的分子生物学机制。

1986 年 *Rb* 基因被克隆出来，就像以前推测的那样，发生突变导致基因失活。在一些视网膜母细胞瘤中，这些突变涉及 *Rb* 基因及其邻近 DNA 序列的大量缺失。这些肿瘤 DNA 的 Southern 杂交印迹实验发现突变的 *Rb* 等位基因呈纯合子形式。这说明一条染色体上的 *Rb* 等位基因**失活**后，另一条同源染色体相关区域缺失，导致这一区域的杂合性缺失。

如上面所提到的，继承了一个缺陷 *Rb* 基因拷贝的 *Rb* 基因在青少年时期也容易患骨肉瘤。用 *Rb* 基因探针，我们可以证实这些骨肉瘤细胞也携带了结构改变的 *Rb* 基因（图 7.12）。同时，这些发现强调了迄今仍未解决的问题：一个基因，如 *Rb* 基因，在全身许多组织均起作用，当其缺陷形式从父母遗传下来时，主要引起视网膜和骨组织肿瘤，为什么不是所有组织面临同样的危险率？

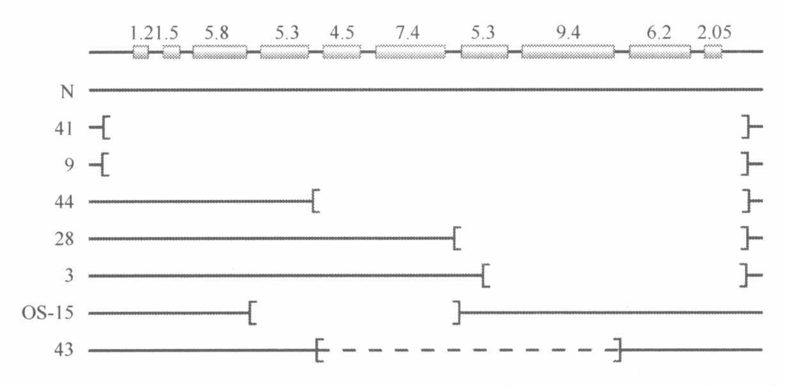


图 7.12　*Rb* 基因突变　用 *Rb* cDNA 作为探针，用大量来自于视网膜母细胞瘤和骨肉瘤的基因组 DNA 进行 Southern 杂交实验。*Rb* 基因的 10 个外显子（蓝色柱状），每个长度以 kb 计算。这个基因的正常形式包含一段约 190 kb 的染色体区域。然而，视网膜母细胞瘤 DNA 片段分析显示这个基因的重要部分发生缺失。这些缺失的起点和终点用括号表示。因此，9 号和 41 号肿瘤丢失了整条 *Rb* 基因和它两端邻近的基因组 DNA 片段。44 号、28 号和 3 号肿瘤中 *Rb* 基因的右半部分及其右侧的染色体片段不同程度的丢失。骨肉瘤（OS-15）和视网膜母细胞瘤（43）*Rb* 基因的中间部分缺失，强烈提示这段 190kb 的 DNA 片段，而并不是左侧或右侧的 DNA 片段，是这些肿瘤形成过程中发生突变失活的重复靶位点（虚线显示 43 号肿瘤中的基因缺失成杂合性）。(From S. H. Friend et al.，Nature 323：643-646，1986.）

7.6 通过杂合性缺失事件寻找抑癌基因

大量作用类似 *Rb* 基因的抑癌基因被假定散布于人类基因组，在许多种人类肿瘤的发病中起一定的作用。20 世纪 80 年代末，致力于发现抑癌基因的研究者们面临一个实验上的困惑：对于明显存在的基因，当它们从人类基因组丢失时，如何发现它们？作用明显的癌基因，完全相反，可以通过在反转录病毒基因组中的存在，通过转染试验或者通过许多原发肿瘤中存在大量基因扩增的染色体片段内的存在而很容易检测到。

我们需要一个更为普遍的方法，这种方法不依赖于染色体内缺失的偶然性发现，也不依赖于染色体上一个抑癌基因附近很幸运地存在一个已知基因。然而，一般来说，对于大多数抑癌基因而言，寻找起来并没有那么好的运气。

在肿瘤形成过程中，抑癌基因倾向于发生杂合性缺失，这为肿瘤研究人员提供了一个新的遗传学方法来寻找它们。因为抑癌基因邻近的染色体区域与抑癌基因一起发生杂合性缺失，我们可以依据特定类型肿瘤发生过程中某个尚未克隆的抑癌基因其邻近区域的匿名的遗传学标志物来检测该抑癌基因的存在。为了这一论点，我们假定酯酶 D 基因为一个匿名的遗传学标志物（虽然我们恰好知道它可以编码一个功能明确的酶）。[虽然杂合性缺失与大多数抑癌基因第二个野生型拷贝的缺失有关，某些这类基因的拷贝可能通过其他机制丢失（补充材料 2 ◎）]。

最初研发的用于检测杂合性和杂合性缺失的方案，用分布于整个基因组的特定 DNA 片段作为遗传学标志物。在一些个体，这样一些 DNA 片段可以被限制性内切酶切割，而在另外一些个体，同样的 DNA 片段由于在限制性内切酶识别位点单个碱基的替换而无法被切割（图 7.13）。因为这些序列变异率在人类基因中表现为正常遗传学变异的结果，这些位点被认为代表多态性遗产标志物（补充材料 1 ◎）。而且，这个序列的等位基因形式或允许或不允许限制性内切酶切割，这样一个标志物被称为限制性片段长度多态性（RFLP）。

肿瘤遗传学家们用限制性片段长度多态性标志物判断特定类型肿瘤发生中多种染色体区域是否频繁发生杂合性缺失。图 7.14 显示了用 RFLP 技术在一组结直肠肿瘤中寻找杂合性缺失的结果。在这一例中，用至少一个 RFLP 标志物表示大多数染色体的长臂和短臂，并研究整条染色体臂的命运。注意在这一系列人类肿瘤中，17 号染色体短臂和 18 号染色体长臂有非常高的杂合性缺失发生率，远远高于这些肿瘤细胞中所有染色体平均 15%～20%的杂合性缺失发生率。

在结直肠肿瘤中影响所有染色体臂的杂合性缺失的正常范围显示：所有染色体区域倾向于以某种频率发生杂合性缺失。然而，如果杂合性缺失碰巧发生在某一区域阻碍了一个抑癌基因，发生这一变化的细胞将优先发生增殖或存活，使携带这一特定杂合性缺失的肿瘤数量大增。

肿瘤中 17 号和 18 号染色体的特定染色体臂频繁发生杂合性缺失，这一事实提供了有力的证据证明这两个染色体臂中存在尚未确知的抑癌基因，并且发生了杂合性缺失。因此，这一遗传学定位为这些基因克隆提供了明确的提示，在基因组的这

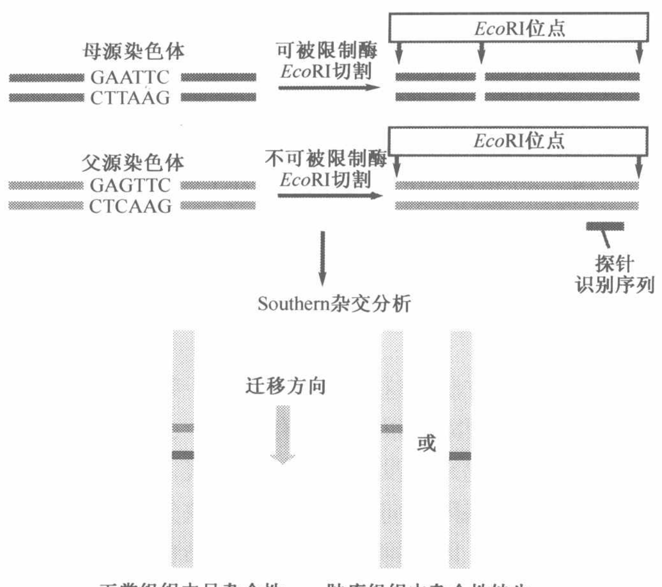


图 7.13　限制性片段长度多态性和肿瘤抑癌基因定位　以染色体 DNA 区域限制酶酶切位点的存在与否作为遗传学标志物可以辅助染色体区域的遗传学分析。如图所示，母系来源的染色体片段（红色）可以被 *Eco*RI 酶切割，而同源的父系来源的染色体片段由于单个碱基的替换而无法切割；这个碱基替换的存在与否表示一个限制性片段长度多态性（RFLP）。用一个可以识别父系片段右侧末端的放射性探针，通过 Southern 杂交实验分析是否发生切割。我们可以通过检验一个酶切片段的存在与否检验遗传学上像孟德尔等位基因的 DNA 序列的遗传。在这个病例中，两个肿瘤患者的正常组织在这一染色体区域呈杂合性，然而在他们的肿瘤 DNA 中发生了杂合性缺失。在一个肿瘤患者的肿瘤 DNA 中父系等位基因丢失，而另一个患者的肿瘤 DNA 中母系等位基因丢失。

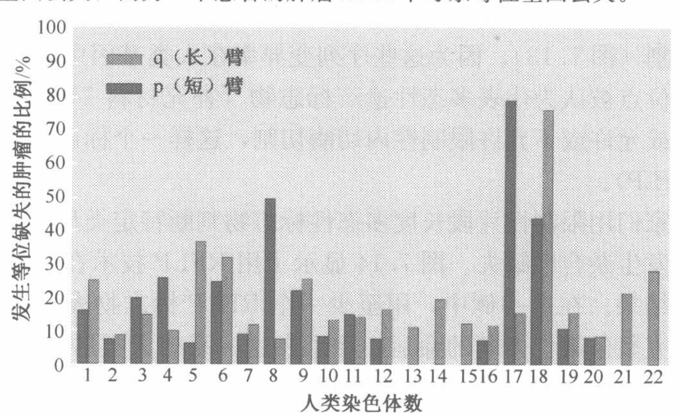


图 7.14　结肠肿瘤中染色体臂杂合性缺失、这个柱形图显示了通过 RFLP 标志物分析得到的一系列结直肠肿瘤中人类染色体臂的遗传学行为（图 7.13）。人类染色体长臂用绿色柱显示，短臂用橙色柱显示。对于 22 条人类染色体中的一些染色体（13、14、15、21 和 22 号），只分析其长臂。纵坐标显示的“等位基因缺失”与杂合性缺失相当。这些分析对关键抑癌基因的定位测量很不精确，因为当时几乎没有探针能够在每个染色体臂的限定范围内判断 LOH（此外，定位于 5q 区域的 APC 抑癌基因非常大，经常发生突变失活，后来发现在几乎所有结直肠肿瘤中均失活。结果，这个基因的第一个拷贝失活后，第二个完整的基因拷贝多通过另一种独立的突变失活，而不是通过杂合性缺失，也因此低估了它在结直肠肿瘤发展中的作用）。这些资料明确提示染色体 8q 区域存在一个抑癌基因，这个基因从未被发现。（From B. Vogelstein et al.，Science 244：207-211，1989.）

些区域寻找在结直肠肿瘤发展中起重要作用的关键抑癌基因。最近以来，肿瘤遗传学家们已经用其他分子生物学方法检验肿瘤细胞基因组中的序列多态性（信息栏7.4）。

信息栏7.4　聚合酶链反应可以从基因水平快速绘制肿瘤抑制基因图谱　近年来，通过聚合酶链反应（PCR）扩增特定染色体片段检测遗传标记已经代替了限制片段长度多态性（RFLP）。这种杂合性缺失（LOH）分析的一般形式，是PCR反应中的两条DNA引物中的一条与人类基因库中呈现多态性的DNA序列互补；另一条引物则与人类基因库中未发生改变的互补链结合。第一条引物可以与序列的一种等位基因形式结合而与另一种不结合，这种能力可以用来检测在制备的DNA中是否存在特定的等位基因（图7.15）。多个PCR反应可以同时进行，这使得遗传学家们能同时检查多个多态性遗传标记的组成。这也促进了分布于基因组中的成千上万个这类遗传标记的发现。因而使每条染色体臂上遗传标记的密度极大地增加，这就使精确地定位肿瘤抑制基因称为可能，这种方法比图7.14中描述的非常粗略的作图技术要精细得多。

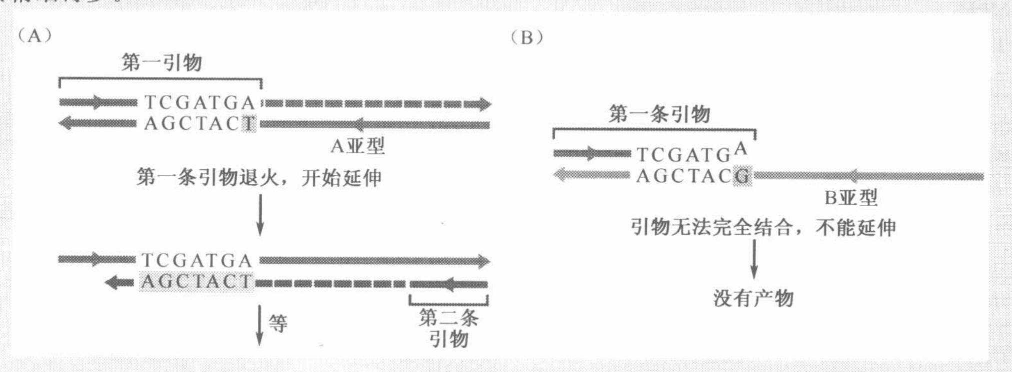


图7.15　通过聚合酶链反应确定序列多态性　聚合酶链反应（PCR）可被用于确定是否存在单核苷酸多态性（SNP）——这种多态性是指两条等位基因中只有一个核苷酸不同（在人类基因组中约有300万个SNP，其中29%存在于人类基因库中，其等位基因频率为5%或更多）。(A）在这种分析方法中，第一条引物（蓝色）与一条等位基因序列（红色链）完全结合，向右的引物延伸反应（蓝色虚线）得以正常进行，进而为第二条引物（棕色虚线）的向左延伸提供了模板。(B）然而，如果第一条引物与另一条等位基因（浅绿色线）的序列不完全互补，向右的引物延伸就无法进行。在一组反应中，通过PCR扩增使序列片段拷贝数累积至数十万，在另一组反应中则没有PCR产物，因此可以通过PCR产物的有无来验证一个SNP位点是否存在。箭头表示DNA链从5′端到3′端。

更加强大的作图技术的应用允许遗传学家们在每个染色体臂的遗传图谱中频繁使用多态性标志物。在特定的染色体臂中，一些标志物与其他标志物相比更频繁地发生杂合性缺失。很明显，这些标志物离抑癌基因越近（遗传学联系越密切），它们与抑癌基因一起发生杂合性缺失的概率就越高。相反，标志物在染色体臂上离抑癌基因越远，协同发生杂合性缺失的概率就越低。最近，通过对多种人类肿瘤来源的DNA进行遗传学分析，发现了大量频繁发生杂合性缺失的染色体区域，分离出30多个抑癌基因（表7.1）。

表 7.1　已被克隆的人类抑癌基因

基因名称	染色体定位	家族性癌症综合征	散发性癌症	蛋白功能
RUNX3	1p36	—	胃癌	TF 辅助因子
HRPT2	1q25-32	甲状旁腺肿瘤，颌骨骨化性纤维瘤	甲状旁腺肿瘤	染色质蛋白
FH	1q42.3	家族性平滑肌瘤[a]	—	延胡索酸酶
FHIT	3p14.2	—	许多类型	二腺苷三磷酸水解酶
RASSF1A	3p21.3	—	许多类型	多种功能
TGFBR2	3p2.2	HNPCC	结肠、胃、胰腺癌	TGF-β 受体
VHL	3p25	Von Hippel-Lindau 综合征	肾细胞癌	HIF 泛素化
hCDC4	4q32	—	子宫内膜癌	泛素连接酶
APC	5p21	家族性腺瘤息肉	结直肠、胰腺胃癌前列腺癌	β-catenin 降解
NKX3.1	8p21	—	前列腺癌	同源异型盒基因 TF
p16^{INK4A} [b]	9p21	家族性黑色素瘤	许多类型	CDK 抑制因子
p14^{ARF} [c]	9p21	—	所有类型	p53 稳定因子
PTC	9q22.3	痣样基底细胞癌综合征	髓母细胞瘤	hedgehog GF 受体
TSC1	9q34	结节性硬化	—	mTOR[f] 抑制因子[f]
BMPR1	10q21-22	幼年性息肉病	—	BMP 受体
PTEN[d]	10q23.3	Cowden's 病乳腺胃肠癌	胶质母细胞瘤；前列腺、乳腺、甲状腺癌	PIP_3 磷酸酶
WT1	11p13	Wilms 肿瘤	Wilms 肿瘤	TF
MEN1	11p13	多发性内分泌腺瘤	—	组蛋白修饰，转录阻遏蛋白
BWS/CDKN1C	11p15.5	Beckwith-Wiedemann 综合征	—	p57^{kip2} CDK 抑制因子
SDHD	11q23	家族性副神经节瘤	嗜铬细胞瘤	线粒体蛋白[e]
RB	13q14	视网膜母细胞瘤骨肉瘤	视网膜母细胞瘤；肉瘤；膀胱、乳腺、食管、肺癌	转录阻遏受，E2F 控制
TSC2	16p13	结节性硬化	—	mTOR[f] 抑制因子[f]
CBP	16p13.3	Rubinstein-Taybi 综合征	急性髓细胞白血病[g]	IF 辅助因子
CYLD	16q12-13	圆柱瘤	—	去泛素化酶
CDH1	16q22.1	家族性胃癌	侵袭性癌症	细胞间黏附
BHD	17p11.2	Birt-Hogg-Dube 综合征	肾癌错构瘤	未知
TP53	17p13.1	Li-Fraumeni 综合征	许多类型	TF
NF1	17q11.2	1 型神经纤维瘤	结直肠癌星形细胞瘤	Ras-GAP
BECN1	17q21.3	—	乳腺、卵巢、前列腺	自噬作用
PRKAR1A	17.q22-24	多发性内分泌腺瘤[h]	多发性内分泌肿瘤[h]	PKA 亚基
DPC4[i]	18q21.1	幼年性息肉病	胰腺、结肠癌	TGF-β TF
LKB1/STK11	19p13.3	Peutz-Jegher 综合征	错构性结肠息肉	丝氨酸/苏氨酸激酶
RUNX1	21q22.12	家族性血小板紊乱	急性髓细胞白血病	TF
SNF5[j]	22q11.2	横纹肌性综合征	恶性横纹肌样瘤	染色体重建
NF2	22q12.2	神经纤维瘤定位综合征	神经鞘瘤，脑膜瘤，室管膜瘤	细胞骨架与膜连接

a 家族性的平滑肌瘤包括多种纤维瘤、皮肤性肌瘤和肾细胞癌。该基因产物是三羧酸循环的一个组成成分。

b 即 *MTS1*、*CDKN2* 和 *p16*。

c 鼠 *p19*^{ARF} 的人类同源基因。

d 也被称为 *MMAC* 或 *TEP1*。

e *SDHS* 编码琥珀酸-泛醌氧化还原酶亚基 D，线粒体呼吸链复合体 II 的一个组成成分。

f mTOR 是一个丝氨酸/苏氨酸激酶，在其他的进程中，它控制了翻译的速率和 Akt/PKB 的激活。TSC1（hamartin）和 TSC2（tuberin）共同控制了细胞的大小和增殖。

g *CBP* 基因参与了与 AML 相关的染色体易位。这些易位可能揭示了一个 *CBP* 片段作为癌基因而不是抑癌基因的功能。

h 也被命名为 Carney 复合体。

i 编码与 TGF-β 信号相关的 Smad4 TF，即 *MADH4* 和 *SMAD4*。

j 人类 SNF5 蛋白是大 Swi/Snf 复合体的一个组成成分，这个复合体负责以一种方式重建染色体，这种方式通过组蛋白去乙酰化酶的作用抑制转录。横纹肌样易感综合征包括对于非典型畸胎型/横纹肌样瘤、脉络膜丛状癌、成神经管细胞瘤、特殊的肾横纹肌样瘤的易感性。

部分改编自 E. R. Fearon，Science 278：1043-1050，1997；and in part from D. J. Marsh and R. T. Zori，*Cancer Lett* 181：125-164，2002.

7.7 可遗传的突变的抑癌基因可以解释许多家族性癌症的发生

以 *Rb* 基因为例，大部分已被克隆的抑癌基因（表 7.1）都与家族性及散发性癌症相关。一般来说，大部分这些缺陷性等位基因的遗传增加了一种常常在人群中较为罕见的肿瘤，或其他特殊类型癌症的巨大风险。在一些情况下，这些突变的种系等位基因导致了多种癌症类型的易感性，如 *Rb* 基因。

在本章的后部，我们将详细描述一些抑癌基因编码蛋白的作用机制。然而，即便是一个粗略的检查（表 7.1）也清楚地显示：为了减少癌症发生的风险，这些基因利用多种蛋白在细胞内的不同定位来执行不同的功能。实际上，这些在其他方面并无关联的基因的唯一共同特征就是抗癌功能（表中的一些抑癌基因参与散发癌症而为人所知，但这些基因的突变等位基因是否最终会出现在种系细胞中，从而导致个体患一种或其他类型癌症的机制还不得而知）。

一个突变的抑癌基因等位基因的遗传可能会进一步增加癌症风险，反之则不然：并不是所有的家族癌症综合征都可以找到一个可以遗传的抑癌基因等位基因。如我们在之后的第 12 章所讨论的，一个二级基因的种系突变也会导致癌症的易感性。这些基因负责维护细胞内基因组的稳定性，减少突变和染色体异常。癌症发生取决于个体的体细胞基因组突变的积累，减少体细胞基因突变频率（如这些基因组维持基因），具有高效抑癌的功能。相反，基因组维持缺陷会增加基因的突变率，从而使患癌症风险大大增加。

因此，体内存在两类不同的家族性癌症基因——在本章中描述的抑癌基因和在第 12 章描述的基因组维持基因。抑癌基因的功能是直接控制细胞生物学行为，影响细胞增殖、分化或死亡，通过这样的方式发挥作用的基因有时也被称为**看门基因**（gatekeepers），允许或不允许细胞通过生长和分裂周期而发展。DNA 维持基因只有间接地通过控制细胞积累突变的速率来影响细胞的生物学行为，这些基因由于其在维持细胞内基因组的作用而被命名为**看护基因**（caretakers）。与突变的看门基因和看护基因等位基因不同，突变的原癌基因等位基因很少通过种系细胞传递（信息栏 7.5）。

信息栏 7.5 为什么突变的抑癌基因可以通过种系传递，而突变的原癌基因通常并不可以？ 许多家族性癌症综合征已经明确与突变的抑癌基因的种系等位基因相关（表 7.1）。然而，也有极少数例外，突变的原癌基因等位基因（如被激活的癌基因），并不能导致先天性癌症的易感性。我们该如何解释这种明显的差异？

产生活性癌基因的突变可能起因于**配子形成**过程中的突变频率，这是形成精子和卵子的过程，而且可能会传递给受精卵。然而，因为癌基因在细胞水平上为显性基因，这些突变的等位基因可能干扰了正在发育的胚胎个体细胞的行为，因此中断了正常组织的发育。结果，携带这些癌基因等位基因的胚胎不能发育至终，且这些突变的等位基因会从一个家族的种系细胞中消失，最终从这个种族的基因库中消失（例如，2004 年的实验报告表明：起源于携带激活了 K-*ras* 癌基因突变的精子的小鼠胚胎只能发育至妊娠中期，在这个时间点它们由于胎盘和胚胎内发育缺陷而死亡；详见信息栏 5.8）。

携带突变抑癌基因的种系细胞生物学行为有非常大的差异。因为这些位点在细胞水平是隐性表达，它们并不明显存在于胚胎的大部分细胞中。因此可遗传的突变抑癌基因经常与正常的胚胎发

育相容，它们导致的癌症表型只在少量细胞中显现，并在延迟了很久后，携带着这些突变等位基因的个体可以正常发育，活过大半的成年时期。

如果突变的抑癌基因有万分之一或十万分之一的概率发生了LOH，并且如果一个成年人具有10^{13}个以上的细胞，为什么一个携带一个突变的抑癌基因的人没有患成千上万甚至是上百万种的癌症？因为肿瘤发生是一个多步骤的过程（正如我们在第11章所见）。一个突变的基因（无论它是癌基因还是抑癌基因）对于肿瘤形成是必要的，但并不是充分的条件。因此，一个个体的许多细胞，它们遗传了一个突变的抑癌基因，非常可能发生了该基因的LOH，但只有极少数的细胞存在相应的遗传学改变，而这种改变导致了临床上可被诊断的肿瘤。

7.8 启动子甲基化是一种抑癌基因失活的重要机制

如补充材料2◎中简单提到，将甲基化基团添加至胞嘧啶碱基可以改变DNA分子。近来的研究结果表明，这种基因组DNA的修饰与突变同样可以关闭抑癌基因。在哺乳动物细胞中，当胞嘧啶碱基定位于鸟嘌呤的5′端，即在序列CpG中，才发现存在甲基化（这种MeCpG修饰经常被命名为“甲基化的CpG”，虽然只有胞嘧啶被甲基化）。这种甲基化能够影响DNA在染色体这一区域的功能。更为特殊地，当CpG甲基化发生在基因启动子区附近，它能够导致相应基因转录抑制。相反，当甲基基团从一簇位于基因启动子区甲基化的CpG上移走时，该基因转录可以激活。

CpG甲基化的状态影响转录的方式还没有得到很好的解释。然而，一种重要的机制已被发现：一种蛋白复合体包括能够识别并结合甲基化CpG的亚基和具有组蛋白去乙酰化酶（HDAC）功能的亚基。当这种蛋白复合体与染色体DNA结合后，组蛋白去乙酰化酶移走附近染色体组蛋白氨基酸侧链上的乙酰基团。这种组蛋白去乙酰化引发了一系列反应，使染色体从倾向转录的状态变为阻遏转录的状态。

仔细检查细胞内DNA的甲基化CpG可以发现，互补DNA链的双核苷酸序列（在DNA链上当从5′→3′的方向阅读时总是CpG）也几乎确定包含MeCpG。当DNA的一段在S期被复制时，母本DNA链的MeCpG（反向）相对的新形成的子链CpG，最初是没有被甲基化的，一类甲基化酶很快会弥补这一缺陷，这类酶被命名为**维持性的甲基化酶**（maintenance methylase），它可以将甲基基团转移至新合成的CpG上（图7.16）。

维持性甲基化酶的作用表明，理论上，CpG序列的甲基化状态可以通过多次的DNA复制来维持，这种方式与DNA核苷酸序列的维持一样稳定。因此，CpG甲基化状态也可以作为能够遗传的特性从一个细胞传递给子细胞。然而，对于遗传而言，DNA甲基化不能改变DNA的核苷酸序列，因而被认为是非遗传的，也就是说，一种**表观遗传**（epigenetic）的机制控制了基因表达。

个体的某些细胞中，一个特殊的CpG序列常被甲基化，其余细胞则不然。这表明DNA甲基化是可逆的。因此，应该存在可以移走CpG上甲基基团的酶。当DNA复制时，即使其互补母本链是被甲基化的，新形成链中一个CpG的甲基化也可被阻碍；在接下来DNA复制中拷贝这一新形成的链时，产生的双螺旋结构在这一位置两条链都缺少甲基基团。作用相反的，将甲基基团添加在以前没有甲基化的CpG上的酶，被命名

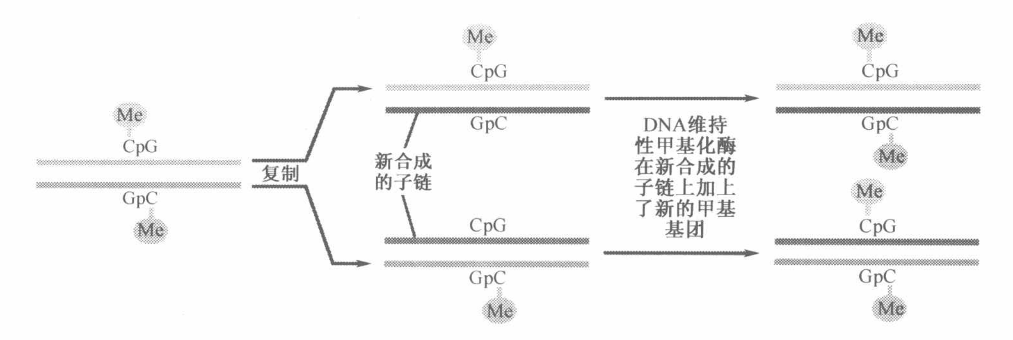


图 7.16 DNA 复制中维持甲基化的方式 当一个 DNA 双螺旋经复制后在互补的 CpG 位点（绿色的甲基基团，左边）被甲基化，新合成的子螺旋最初在新合成的子链的 CpG 缺少甲基基团，因此是半甲基化状态。然而，在它们合成后很短时间，维持性 DNA 甲基化酶将检测到半甲基化的 DNA，然后使甲基基团（绿色）接近这些 CpG，因而重新产生相同的甲基基团配置，这种配置存在于复制之前的母本的双螺旋。在母本螺旋中未被甲基化的 CpG 位点（没有显示）将被维持性甲基化酶忽略，因此在新合成的链中也保持这样。

为**从头甲基化酶**（*de novo* methylase），以便与维持性甲基化酶区分，后者可使一种已存在的甲基化模式永存，这种模式可在新合成 DNA 上添加甲基基团（图 7.16）。

所有的后生动物中并不都存在 CpG 甲基化，它是一种高级进化。在胚胎发生的早期许多基因的转录状态就已决定，并且传递给胚胎各个不同部分的后代细胞。可通过细胞代和代的遗传传递的 CpG 甲基化，是一种高度有效的方式，以保证来源于一个早期胚胎后代细胞的许多细胞后代，继续遵循和保持在胚胎时祖先所做出的决定。

我们可以想象：在癌细胞的基因组中，保证 DNA 是否正确甲基化的机制可能偶然出错，结果会在肿瘤细胞基因组的甲基化状态中产生两种相反的改变。在一些肿瘤发生进程中，经常会发现整个基因组甲基化水平进行性的减少（使用补充材料 3 描述的技术）。这表明，由于未知原因，维持性甲基化酶不能有效执行功能。这种“广泛甲基化不足”可导致细胞基因组高度重复序列的 DNA 甲基基团丢失；这种丢失与染色体不稳定性相关，但还并不清楚是否真正导致了染色体不稳定。

与广泛的甲基化不足不同，还存在另一类 DNA 区域——包含高度密集 CpG 区域，被称为“CpG 岛”——常在癌细胞基因组中被异常甲基化。这些 CpG 岛常存在于基因启动子区（图 7.17），这表明从头甲基化酶使某些基因发生沉默，而这些基因原本应该保持转录激活。

如果发生在基因的启动子区，CpG 甲基化可以有效关闭基因表达；相反，基因本身 DNA 序列发生了甲基化，如外显子序列，对于转录效果作用甚微。既然启动子区甲基化可使基因沉默，就如同核苷酸序列发生突变，我们可预测在肿瘤发展阶段，甲基化在使一个抑癌基因发生沉默中，发挥了重要作用。

实际上，在近些年来，越来越明显地发现，启动子区甲基化在关闭抑癌基因方面发挥重要作用。多于一半的抑癌基因，由于种系突变而参与家族性癌症综合征，在散发的癌症中因启动子区甲基化而沉默。例如，当 *Rb* 抑癌基因在生殖细胞中发生突变后，导致家族性的视网膜母细胞瘤。然而，在散发的视网膜母细胞瘤中，这一抑癌基因或是通

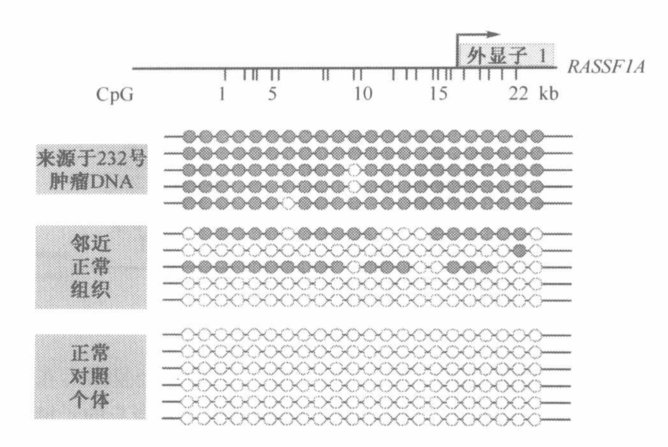


图 7.17 *RASSF1A* 启动子区的甲基化 重亚硫酸盐测序技术（补充材料图 1）已被用于测定抑癌基因 *RASSF1A* 启动子包含 CpG 岛的甲基化状态。每个圆圈代表一个岛中明显的 CpG 核苷酸对，定位于 *RASSF1A* 启动子区内的通过图中垂直的记号线来标明（上部）。填充的圆圈（蓝色）表明 CpG 已被甲基化，而空的圆圈表明它是未甲基化的。对来源于肿瘤 232 的 5 个 DNA 样品进行分析发现，几乎所有 *RASSF1A* CpG 岛的 CpG 位点都发生了甲基化；邻近的，表面正常的组织大部分（但并不是所有的）未甲基化。来源于一个正常个体对照 DNA 分析表明在这个 CpG 岛缺少 CpG 甲基化（这些数据提示一些在邻近肿瘤 232 的癌旁正常组织中非正常细胞的存在）。(Courtesy of W. A. Schulz and A. R. Fiori)

过体细胞突变或是通过启动子区甲基化而失活。另外，一系列其他基因，已被了解或被认为能够抑制肿瘤的形成，它们的启动子已发现处于甲基化的状态（表 7.2）。

表 7.2 在人类肿瘤细胞基因组中发生超甲基化的基因举例

基因名称	蛋白功能类型	肿瘤类型
RARβ2	分化核受体	乳腺、肺
$p57^{Kip2}$	CDK 抑制因子	胃、胰腺、肝、急性髓细胞性白血病
TIMP3	金属蛋白酶抑制因子	不同肿瘤
IGFBP	消减 IGF-1 因子	不同肿瘤
$CDKN2A/p16^{INK4A}$	CDK4/6 抑制因子	不同肿瘤
$CDKN2B/p15^{INK4B}$	CDK4/6 抑制因子	不同肿瘤
$p14^{ARF}$	HDM2/MDM2 抑制因子	结肠、淋巴
APC	诱导 β-catenin 降解	结肠癌
p73	帮助 p53 触发凋亡	不同肿瘤
GSTP1	诱变失活因子	乳腺、肝、前列腺
MGMT	DNA 修复酶	结直肠
CDH1	细胞间黏附受体	膀胱、乳腺、结肠、胃
DAPK	参与细胞死亡激酶	膀胱
MLH1	DNA 错配修复酶	结肠、子宫内膜、胃
TGFBR2	TGF-β 受体	结肠、胃、小细胞肺癌
THBS1	血管生成抑制因子	结肠、神经胶质母细胞瘤
RB	细胞周期调控因子	视网膜母细胞瘤
CASP8	凋亡 Caspase	神经母细胞瘤、小细胞肺癌
APAF1	促凋亡级联反应	黑色素瘤
CTMP	抑制因子	多形性胶质母细胞瘤

部分改编自 C. A. Eads et al. ,Cancer Res. 61:3410-3418,2001.

一些候选的抑癌基因很少由于体细胞基因读码框突变而失活。例如，*Runx3* 基因，参与胃癌发生，在胃癌中有 45%～60%发生甲基化，几乎不因突变失活。像这样的情况，给企图通过检查一个抑癌基因的失活来研究一种或多种肿瘤形成带来困难。以前的研究需要在肿瘤细胞中发现基因突变或缺失，而现在这种遗传学的分析（对肿瘤细胞基因组一个抑癌基因等位基因的测序结果）不再是绝对的标准，因为某些抑癌基因只是通过启动子区甲基化而发生沉默（实际上，解释一个启动子在多种肿瘤中都存在甲基化的机制还有困难；这一发现只能反映肿瘤来源于一个正常细胞的事实，这个细胞中的某个基因作为正常分化程序的一部分而发生了甲基化）。

启动子甲基化可以消除抑癌基因的功能，原则上，可通过两种途径之一产生。一个抑癌基因的两个拷贝可能会独立地被甲基化，或者，伴随着一个已甲基化的抑癌基因拷贝的复制，一个拷贝被甲基化而第二个通过杂合性缺失（LOH）而丢失。实际上，第二种机制似乎频繁发生。例如，在对吸烟者、曾吸烟者和从未吸烟者的肺正常支气管（大的气管支路）上皮中 $p16^{INK4A}$ 基因（将在 8.4 节中介绍）的甲基化研究发现：44%的来源于吸烟者和曾吸烟者的（表面上正常）支气管上皮细胞发生了甲基化，而来源于从未吸烟的人的对照细胞则没有发生任何甲基化。这一染色体区域的 LOH 在两种吸烟人群中的比例为 71%～73%，而在从未吸烟人群中为 1.5%～1.7%。

抑癌基因的甲基化拷贝经常发生杂合性缺失表明：在每代细胞中甲基化的发生频率相当低，实际上，远低于 LOH 的发生（如果甲基化总比 LOH 更频繁发生，肿瘤会表现为两种抑癌基因的拷贝，一种父本来源，另一种为母本来源）。显然，肿瘤细胞发生主要通过 LOH 而不是启动子甲基化引起。

对以上描述的形态学上正常的支气管上皮细胞的研究给了我们一些启示：控制生长的关键基因常较早发生改变，远早于组织学改变，这些表面正常的细胞群体为后来癌前病变和恶性生长提供了肥沃土壤。这一观点同样适用于其他组织，如在图 7.18 中进行分析的组织学上正常的乳腺组织。

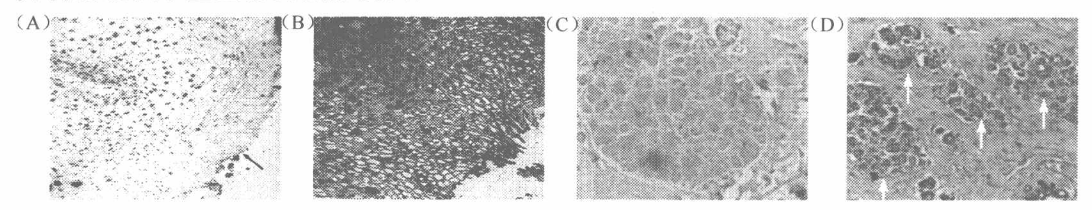


图 7.18 原位测量 DNA 甲基化 在细胞基因组中特殊位点甲基化存在与否能够通过甲基化特异的聚合酶链反应（补充材料图 1）和原位杂交的方法，对组织切片进行检测。在这些图像中，$p16^{INK4A}$ 抑癌基因启动子区甲基化状态可以使用一种甲基化特异的探针分析，在这个基因启动子区被甲基化的区域产生了黑色着色。(A) 在低分化的宫颈鳞状上皮内（左），位于距离子宫表面有一段距离的细胞核发生了启动子甲基化，而那些接近细胞表面（箭头所示）的则没有。(B) 然而在一个邻近的高分化区域，那里将形成子宫颈癌（右），所有的这些细胞都发生了启动子甲基化。(C，D) 在这些正常乳腺组织的显微照片中，一些组织学正常的小叶上皮细胞并没有发生启动子甲基化 (C) 而其他（箭头）显示一致的启动子甲基化 (D)，表明这种表面正常的小叶上皮细胞已经开始了癌症进程中起始的关键一步。(A，B，from G. J. Nuovo et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96：12754-12759，1999；C，D，from C. R. Holst et al.，Cancer Res. 63：1596-1601，2003.)

在肿瘤发生进程中，因启动子甲基化而沉默的基因也包括看护基因，它们的责任是维持基因组中的 DNA 序列的完整性。*BRCA1* 基因是一个有趣的例子。它的产物是为了维持染色体 DNA 的正常，其机制目前还不清楚。*BRCA1* 基因突变的遗传结果是一种家族性癌症综合征，它预示着终生乳腺癌高风险和相对低的卵巢癌风险（12.10 节）。一度人们这样认为，*BRCA1* 的失活不会导致散发性的乳腺癌发生，因为在这样一个高发的肿瘤中并未发现该基因的突变。我们现在知道 10%～15%的散发性乳腺癌携带失活的 *BRCA1* 基因拷贝，它通过启动子甲基化方式而发生了沉默。

图 7.19 反应了多种人类肿瘤中 12 个基因启动子甲基化状态。该图清楚表示一个基因的甲基化频率在不同肿瘤间存在很大差异。图表中的数据更加肯定抑癌基因与看护基因一样都发生了启动子超甲基化。通过这个图表我们知道，在众多人类肿瘤的发生发展中，基因启动子甲基化普遍存在。

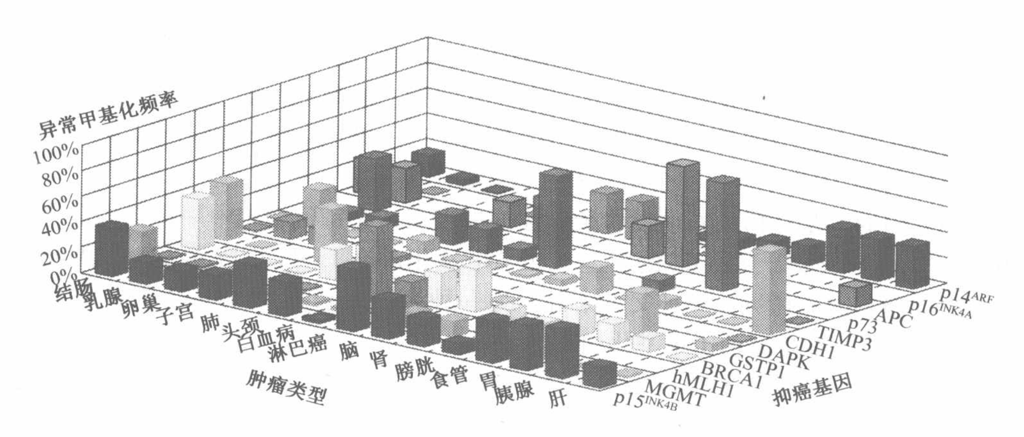


图 7.19　肿瘤细胞基因组中多种基因的甲基化　这个三维条状图表总结了 12 个不同基因（$p16^{INK4A}$、$p15^{INK4B}$、$p14^{ARF}$、*p73*、*APC*、*BRCA1*、*hMLH1*、*GSTP1*、*MGMT*、*CDH1*、*TIMP3*、*DAPK*）启动子区甲基化状态，这些基因已知或被认为在抑制人类肿瘤发展中发挥重要作用。通过甲基化特异的聚合酶链反应技术（补充材料图 1◎）可以测定甲基化状态。这些启动子的甲基化状态已经在 15 种不同肿瘤类型的 DNA 中进行了研究。每一个竖条的高度表明一种类型肿瘤中甲基化的比例，在这种类型肿瘤中特异的启动子已发生甲基化。所有这些启动子在正常组织中是未甲基化（或非常低的甲基化水平）。(Adapted from M. Esteller et al., Cancer Res. 61：3225-3229，2001.）

在特定的一种肿瘤中，多个基因都通过启动子甲基化而被关闭。例如，在对 107 个非小细胞肺癌（NSCLC）患者基因组 8 个关键癌症相关基因甲基化状态的分析中，发现 37%存在至少一种基因的启动子甲基化，22%存在两种基因的启动子甲基化，2%有 5 种基因启动子呈现甲基化状态。虽然只分析了这 8 个基因，但我们可以想象还有其他多个发生超甲基化的基因存在于这些癌细胞基因组中，它们的失活通过各种方式促使了癌症的形成。

启动子甲基化的细胞生理学结果可通过维甲酸对于正常和肿瘤上皮细胞的作用被阐明。在许多上皮细胞中，维甲酸是一种潜在的细胞周期俘获，甚至是细胞分化的诱导剂。比如它被用于中断乳腺癌细胞的进一步增殖，然而，这些癌细胞中的大部分已经通过启动子甲基化而沉默 *RARβ2* 基因，*RARβ2* 基因编码一个关键的维甲酸受体。没有这个受体的表达，乳腺癌细胞对于维甲酸处理无应答，因而避免了生长俘获，而且可以继

续在这种药物存在下生存。

如同以上描述，启动子区 CpG 的甲基化可吸引组蛋白去乙酰化酶（HDAC）分子，它们把附近的染色质蛋白进行装配，使之处于抑制转录的状态。使用一种 HDAC 抑制剂，命名为 trichostatin A（TSA），能够逆转这种去乙酰化反应，从而使染色质逆转至一种允许转录状态。因此，TSA 处理乳腺癌细胞引起的 *RARβ2* 基因的表达被再次激活，恢复了乳腺癌细胞对于维甲酸生长抑制效应的反应性。这个结果清楚表明启动子区甲基化通过组蛋白去乙酰化来促使癌症发生。同时，也表明使用 TSA 和维甲酸同时处理也许是一种乳腺癌治疗方法。

7.9 抑癌基因和蛋白通过多种方式起作用

在前面我们了解到，抑癌基因和它们编码的蛋白通过多种机制阻滞了癌症发展。实际上，将这些基因和它们编码的蛋白放在一起的唯一特点是它们都能够减少癌症发生。仔细检查这些已克隆到的抑癌基因列表（表 7.1），发现它们中一些基因的功能是直接抑制细胞增殖，通过对一系列生长抑制和分化诱导信号的应答来实现；其他一些是细胞内控制周期的组分，它们通过代谢失衡和基因组损伤反应而抑制增殖。

最初两个我们研究比较透彻的抑癌基因是本章开始时讨论的 *Rb* 基因和 *p53* 基因（又被命名为 *Trp53* 或 *TP53*），它们是人类癌症发生过程中扮演重要角色的两个抑癌基因。*Rb* 基因编码的蛋白通过影响细胞的生长和分裂周期来发挥作用，由 *Rb* 基因通路影响的生长控制看来在大多数，或者说可能所有的人类肿瘤中被中断。因为它中枢性的重要功能，我们将用专门的一章来讨论，在第 8 章中我们再讨论这个基因以及它编码的蛋白质。抑癌基因 *p53* 在癌症发展的过程中扮演了同等重要的角色，而且它的产物 p53 控制的通路事实上也在人类所有类型的癌症中被中断。这个抑癌基因和蛋白值得做更深一步的讨论，我们也在第 9 章对 p53 的功能以及由它控制的细胞死亡过程进行一个详细的描述。

另外一些抑癌基因在细胞内通过多种方式抑制了细胞增殖，这些基因的蛋白产物实际上参与了所有控制细胞增殖和生存的信号通路（表 7.1）。表 7.1 中所列出的抑癌基因编码的蛋白中的几种恰好是 *Rb* 和 *p53* 通路的组分，包括在这些通路中的 $p16^{INK4A}$、$p15^{INK4B}$ 和 $p19^{ARF}$ 基因，对于这些基因的讨论将在第 8 和第 9 章进行。

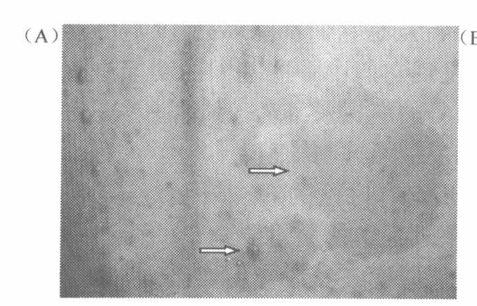
部分其余抑癌基因（表 7.1）的作用机制现在已经比较清楚，表中所列出的基因目前为止还有的机制并不很清楚。我们在这里集中对这些抑癌基因的三种进行深入探讨，目的是为了揭示这些基因产物非常有趣的作用机制。这些例子真的非常神奇，因为它们揭示了细胞为了组织增殖逃逸所进行的配置是多么多样化，也表明在多种抑癌基因编码蛋白决定的特殊生化和生物学行为所遭遇的困难。我们从细胞表面开始向内深入阐述。

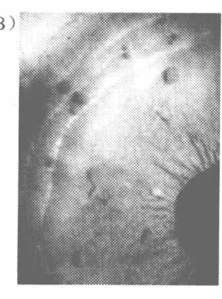
7.10 NF1 蛋白作为一个 Ras 信号的负调控因子

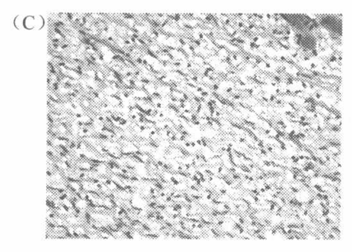
神经纤维瘤病在 1862 年被 Friedrich von Recklinghausen 第一个报道。我们现在知

道神经纤维瘤Ⅰ型（有时被称为 von Recklinghausen's neurofibromatosis）是一种较常见的家族性癌症综合征，世界上的平均发病率为 1/3500。这种疾病的初期特征为在外周神经系统中围绕神经的外鞘细胞发展为良性肿瘤。偶尔，这种神经纤维瘤的一个亚型，发展成为恶性的肿瘤，被命名为**神经纤维肉瘤**（neurofibrosarcomas）。患有Ⅰ型神经纤维瘤的患者也会增加患**神经胶质瘤**（脑部星形胶质细胞系肿瘤；图 2.8A）、**嗜铬细胞瘤**（pheochromocytomas，来源于肾上腺）和骨髓性白血病（图 2.8B）的风险。这些肿瘤包括来源于胚系的多种细胞类型。

神经纤维瘤患者常表现有其他不同来源细胞的异常。其中包括**咖啡牛奶斑**（café au lait spot），在皮肤中发现明显的色素沉积；皮肤和长骨中细胞形态学上的细微改变；认知缺陷；虹膜的良性病变，被称为"Lisch 小体"（图 7.20）。这些表现主要受到患者**遗传背景**的影响（例如，一个个体基因组中所有其他基因等位基因的情况），虽然同胞遗传了应答基因同一个突变的等位基因，叫做 *NF1*，却常戏剧性地呈现不同的疾病表型。







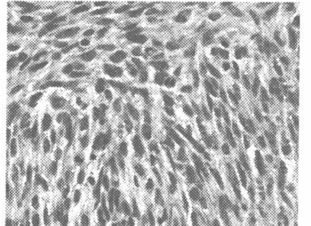


图 7.20 神经纤维瘤病 Ⅰ型神经纤维瘤病因与单个遗传学状态相关而被认为是一种综合征。(A) 在一个患者背部明显存在这些大量小的皮下结节（如神经纤维瘤）和这里可以看到的浅棕色的咖啡牛奶斑（箭头）。(B) 另外，Lisch 小体经常在这些患者眼部的虹膜处被发现。(C) 对于患处组织学观察发现良性的神经纤维瘤（左），可以偶然发展为恶性的神经鞘肿瘤（MPNST，右）。神经纤维瘤组织学上的复杂性给这些生长的正常前体鉴定带来了很多的困难，这些前体现在被认为是包裹在外周神经元外的施旺细胞。(A and C, courtesy of B. R. Korf; B, from B. R. Korf, Postgrad. Med. 83: 79-88, 1988.)

NF1 基因是在 1990 年被克隆的（神经纤维瘤的第二种类型，与一个完全不相关的抑癌基因失活相联系）。*NF1* 基因的遗传学行为与 *Rb* 基因的非常接近。因此，突变失活的 *NF1* 基因等位基因通过种系传递，以显性方式产生了疾病表型。在细胞水平上，基因（$NF1^{+/-}$）最初的杂合状态通过杂合性缺失的方式转变成肿瘤细胞的纯合状态（$NF1^{-/-}$）。最终，和半数神经纤维瘤患者一样多的患者缺少这种疾病的家族史，表明他们携带的这个突变的拷贝是一种种系细胞中从头突变的结果。如同在 *Rb* 基因中的现象，这种从头突变通常在患者父亲的精子发生过程中发生。

一旦克隆的基因被测序，就可能赋予 neurofibromin（*NF1* 编码的蛋白）一种功能：它与 *Saccharomyces cerevisiae* 蛋白（一种酵母蛋白，命名为 IRA）存在广泛的序列相关性，这种蛋白的功能是作为一种酵母的 Ras GTPase-激活蛋白（GAP），就如同两种哺乳动物的 Ras-GAP 蛋白。如同大多数而不是所有真核生物，酵母细胞使用 Ras 蛋白来调控它们的代谢和增殖。详细的遗传学分析已表明：在酵母中，Ras 蛋白的阳性

信号功能可以通过 IRA 蛋白进行定量。通过激活 Ras 来激活了它内在的 GTP 酶活性，IRA 使 Ras 从激活的 GTP-结合形式转变为失活的 GDP 结合的形式；准确地说哺乳动物的 Ras-GAP 蛋白执行了同样的功能。实际上，在 Ras 激活它的下游效应因子之前，一个 Ras-GAP 已经埋伏在它的旁边（5.9 节，信息栏 5.11）。

最初对于 NF1 功能的观察可以设想 NF1 缺陷形式怎样导致疾病表型。NF1 在机体中广泛表达，在成人的外周和中枢神经中的表达水平尤其高。当细胞最初受到生长因子的刺激时，为了使 Ras 信号可以不受到 NF1 的干扰而传递，它们可能降解 NF1。然而，在 60～90min 后，NF1 的表达恢复了正常水平，而且聚集的 NF1 蛋白帮助关闭了更多的 Ras 信号——一种负反馈控制的形式。而神经外胚层细胞中缺少 NF1 的功能，Ras 蛋白可在激活的、GDP-结合的状态下长期存在。实际上，在神经纤维瘤的细胞中（遗传学上为 *NF1*$^{-/-}$），能够检测到激活的 Ras 和 Ras 效应因子蛋白水平的升高（图 7.21）。结果，一个细胞中 NF1 失活在功能上类似激活的由突变的 *ras* 原癌基因产生的 Ras 蛋白（5.9 节）。

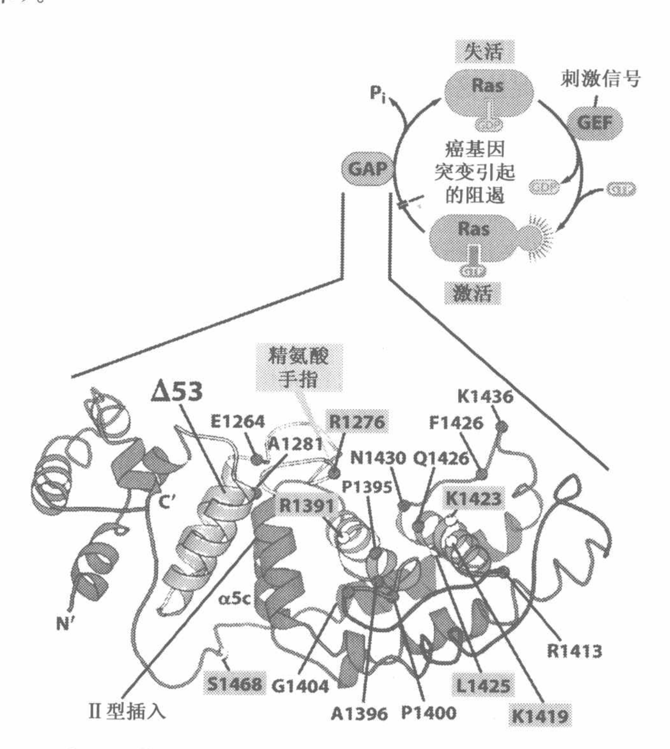


图 7.21 Neurofibromin 和 Ras 信号周期 如图 5.30 表明，Ras 蛋白经历了一个周期，在这个周期中它可以通过胍基核苷酸交换因子（GEF），例如 Sos，然后通过 GTPase 激活蛋白（Ras-GAP）。主要的 Ras-GAP 之一是 Neurofibromin（NF1），它是 *NF1* 基因的产物。Ras 和 NF1 的相互作用增加 GTPase 的活性，是 Ras 单独作用的 1000 倍。这里显示的是 NF1 与 Ras 相互作用区域的结构。NF1 命名为“精氨酸手指”（上部）的一个亚基携带了一个关键的精氨酸（R1276），它被插入到 Ras 的 GTPase 的缝隙中，可以激活 Ras 的 GTP 向 GDP 的水解。浅灰色球体显示的是在神经纤维瘤患者中发现的 NF1（携带氨基酸替换）的突变形式，这种球体通过灰色框被标记；实验产生的突变也产生了许多的氨基酸替换（深灰色球体），它们也影响了 NF1 的 GAP 功能。此外，一段大片段的删除（Δ53）和一个在患者中被发现的插入（“II 型插入”）都与疾病相关。（From K. Scheffzek et al., *EMBO J*. 17：4313-4327，1998.）

神经纤维瘤组织学上的复杂性使鉴定哪些正常细胞类型能够产生这些异常增殖的细胞变得非常困难。显微镜分析（图 7.20C）揭示，这些异常生长是由混合的细胞类型组成的，包括施旺细胞（缠绕和隔离了神经轴突）、神经元、神经外周细胞（好像来源于纤维原细胞，在神经元附近被发现）、成纤维细胞和肥大细胞（来源于免疫系统）。在一些良性肿瘤中，施旺细胞明显是主要的细胞类型，而在其他类型中，成纤维细胞和神经外周细胞则占有主要地位。

有证据表明施旺细胞的前体是神经纤维瘤发生 LOH 的最初靶点，一旦这些细胞丢失了所有的 NF1 功能，它们通过旁分泌信号诱导一系列其他类型细胞共同增殖，使这些组织学上很复杂的不同类型细胞共同增殖，这种共增殖提出了一个有趣的仍然没有答案的问题，然而既然这些其他邻近的细胞类型存在 $NF1^{+/-}$ 基因型，可能它们就比完全野生型的细胞更容易对生长刺激信号产生反应？这样增加的易感性可能由于它们只携带了正常量一半的有功能的 NF1 蛋白。

正常量一半的有功能的 NF1 蛋白确实能影响细胞，而且因此也影响了机体的表型：小鼠的肥大细胞（一种免疫细胞）表达一种部分缺陷 Kit 生长因子受体，非正常地产生了很低的数量，表明 Kit 在促使这些免疫细胞增殖方面有重要作用。然而，$NF1^{+/-}$ 基因型，当存在于具有部分缺陷 Kit 受体的肥大细胞的前体时，导致了该基因型实际上的反转（如一种肥大细胞数量上的正常化），表明 NF1 在其他蛋白（如 Kit 受体）之间操纵了一种抑制性的信号形式；来源于 Kit 受体的不恰当的信号能够通过由于 NF1 功能的部分缺失而增加 Ras 信号来进行补偿。广而言之，在许多细胞类型中正常量一半的有功能的 NF1 蛋白的存在可能会导致一种 Ras 信号实质性的增加，并以这种方式，干扰了细胞表型。

这些观察提出了一个关于抑癌基因更为常见的问题：当基因的两个拷贝均丢失的情况下才可发现抑癌基因失活的全部表型改变，但它们编码蛋白（经常可以在具有 $TSG^{+/-}$ 基因型中被观察到）的一半的剂量在细胞行为学方面产生微弱但却仍然真实的改变——遗传学上的**单倍剂量不足**（haploinsufficiency）现象（信息栏 7.6）。

信息栏 7.6　单倍剂量不足　当半块面包并不强于一点都没有时，抑癌基因失活的 Knudson 假说假定了抑癌基因的突变拷贝在细胞水平呈隐性，因此，抑癌基因是杂合子的细胞（$TSG^{+/-}$）应当在表型上是正常的。但是，也有很好的生化理由表明，表达一个抑癌基因蛋白正常量的一半的细胞有一种明显偏离野生型的表型，而且确实可以在本文发现这些例子。

在 *Rb* 基因的实例中，证据表明 $Rb^{+/-}$ 细胞在表型上总体来说是正常的。任何病理学上异常的细胞都已经丢失了 *Rb* 基因拷贝，通常是通过 LOH，而且因此导致了 $Rb^{-/-}$；$Rb^{+/-}$ 的细胞好像发育完全正常而且表现了正常的功能。

对遗传学改变的小鼠的观察，提供了更为清晰的单倍剂量不足的例子。携带了编码 Smad4 转录因子基因的单个拷贝的小鼠（Smad4 转录因子被 TGF-β 诱导而抑制细胞增殖，详见 8.10 节），能够在胃和小肠中形成息肉，这些细胞继续携带这个野生型基因的单个拷贝。对于 $p27^{kip1}$ 抑癌基因而言是杂合体的小鼠，更可能有肿瘤发生的倾向，没有肿瘤细胞中的 LOH 迹象；这个基因编码了一个细胞周期行进的重要的抑制子（8.4 节）。第三个例子由编码 PTEN 抑癌基因的杂合子小鼠提供（6.6 节），由于缺少的只有这个抑癌基因的单个拷贝而明显加速前列腺癌的发生。最终，*Dmp1* 基因的一个拷贝的删除（该基因编码了一个可以诱导 $p19^{ARF}$ 抑癌基因表达的转录因子），导致在没

有丢失野生型拷贝的肿瘤细胞中进一步增加了肿瘤易感性。总而言之，当在细胞的基因组中只存在一个野生型基因拷贝的情况下，至少一半的人类抑癌基因产生了非正常的表型。

7.11 Apc促进细胞从结直肠隐窝处外移

绝大部分结直肠癌（>95%）是散发性的，只有一小部分是由终生患病风险的遗传导致。对于这些能够遗传的结肠癌综合征最好的例子是结肠腺瘤状息肉，通常叫做家族性腺瘤状息肉（FAP），容易在结直肠处发生腺瘤状息肉。这样的息肉，当它们是非恶性的，倾向于以一种低的但可以预测的频率发展成为肿瘤，在西方这种综合征可以导致少于1%比例的结直肠癌。

西方人群的结直肠癌发病频率相对较高，其原因是目前仍并不很清楚的饮食因素，常常发现在结直肠附近有少量息肉散在分布。当到了70岁时，这些人群中有一半的个体至少存在一个这些的生长点（例如，见图2.15A）。然而，在相对少的患有家族性腺瘤状息肉的个体中，有几百个息肉分布于结直肠的内腔表面，也就是结直肠的表面朝向并进入了结直肠腔（图7.22）。

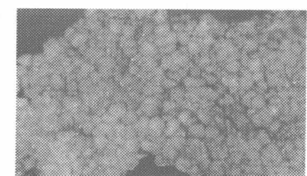
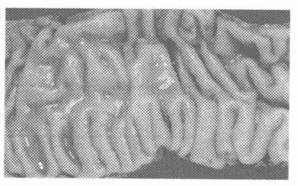



图7.22 家族性腺瘤状息肉 来源于一个家族性腺瘤状息肉（FAP）患者的大肠壁呈地毯状布满了成百上千的小息肉（左）；而这些在一个正常大肠光滑的肠壁上是不存在的（右）。图2.15A中显示大肠息肉一种类型的详细结构。(Courtesy of A. Wyllie and M. Arends.)

*APC*基因（信息栏7.7）的克隆使人们认识到，该基因及其编码蛋白在结直肠内可以控制细胞增殖，我们会在接下来的章节中进行详细的讨论。结肠和十二指肠由典型的上皮细胞组成。相对未分化的干细胞群产生了两种不同类型的子细胞，当它们进行分裂时，一个子细胞继续维持干细胞特征，保证了干细胞在一定的组织中维持恒定数量；另一个子细胞和它的后代继续进行分化。在小肠中，一部分这些分化的上皮细胞参与从内腔中吸收营养，以及转运这些营养物质进入循环；在结肠中，它们可以从内腔中吸收水分。其他上皮细胞也分泌一种类似黏液的物质，可以帮助保护结肠上皮与腔内物质隔离（在胃肠消化道中，这些不同的上皮细胞被命名为**肠黏膜细胞**（enterocyte）。

信息栏7.7 特殊的人类群体对于可遗传的癌症综合症的检测和有关基因的分离提供了便利 在犹他州的Mormons存在一个人类家系，为人类遗传学家研究各种类型的人类遗传疾病提供了极好的机会。在今天的犹他州Mormon人群中，有一个群体的祖先能够追溯到一个相对小的创立定居者的群体，他们在19世纪中期到达了犹他州。Mormon的夫妇们传统上生育较多的子女，而且在相对年轻时便开始生育，产生了一个极大的多代的家庭——这是最理想的遗传学研究对象。

最重要的是，Mormon居住者有一个源于祖先的个体追溯洗礼的信念。结果，Mormon教堂（更可能是现代圣徒耶稣基督教派）鼓励它的成员接受普遍的家系研究。为了方便这样的研究，Mormon教堂在犹他州的盐湖城建立和保存了世界上最大的家系档案，人类遗传学家可以通过他们的家谱来

寻找特殊疾病的易感性基因。因此，从这个意义上来说，犹他州的Mormons具有重要的贡献。

这些因素的汇合可能产生集合多代的家谱，如图7.23中所展示；遗传学家精确地追溯，发现了一个倾向于发生家族性腺瘤状息肉的基因的突变等位基因，该基因如何通过一个家族多代来传递，如何以一种显性的方式控制产生了结肠息肉的易感性和导致结肠癌风险的增加。使用这些关联的分析，这种倾向性的基因的等位基因遗传传递与某些存在于人的染色体上的遗传学标志物相联系后，揭示了这种遗传拷贝从一代传递到下一代，并且与人的第5号染色体短臂上的遗传标志物被共传递，把这些结果与LOH分析一起，最终在1991年使*APC*基因的分子克隆成为了可能。

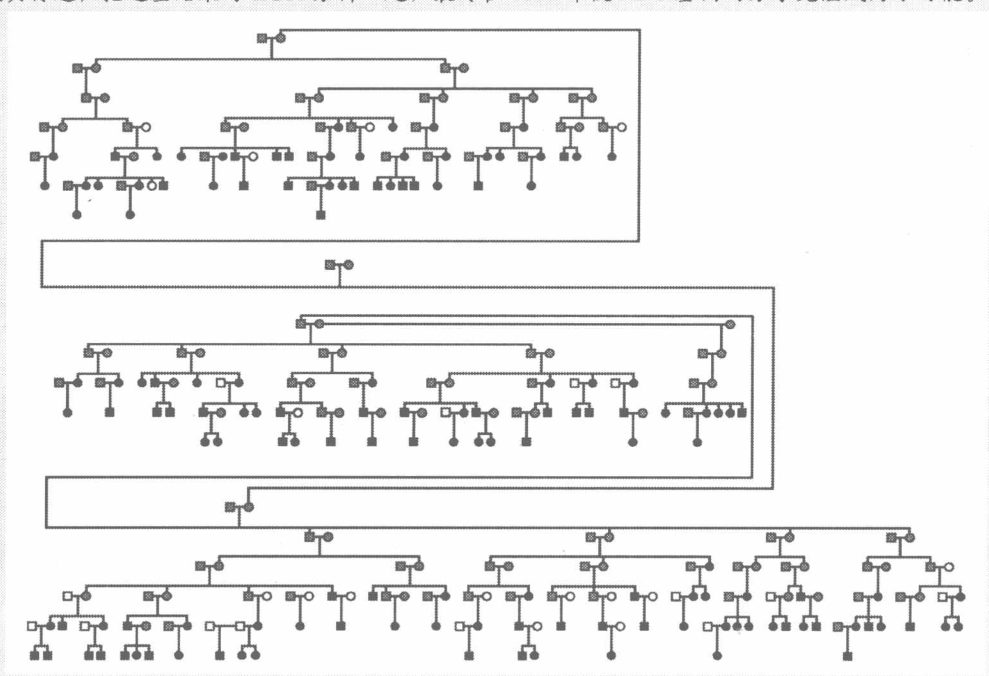


图7.23 使用大的家系描绘遗传学图谱 分析一个先天性癌症易感性综合征（如家族性腺瘤状息肉）的家系中许多个体的基因组，可以使相关基因定位于人类染色体一个较小的区域。以*Apc*基因为例，一个大的存在家族性腺瘤状息肉的Mormon家系的发现，它的亲缘关系可以通过在犹他州盐湖城的广泛家系记录追溯，使这个基因被定位于人类5号染色体短臂的一个很小的区域。患病的个体在这里用填满的标记表示。(Courtesy of R. L. White, M. F. Leppert, and R. W. Burt.)

图7.24A中注明了结直肠中干细胞和分化细胞的定位，可以看出，干细胞通过定位在较深的腔，叫做**肠隐窝**（crypts）的底部而被保护。这些干细胞后代中的一部分仍然在肠隐窝的后部，目的是维持恒定数量的干细胞，大部分细胞则向上分布，在肠隐窝之外朝向上皮层的内腔表面，在那里形成肠的上皮层，通过细胞凋亡的方式死亡，脱落在结肠腔内。这种向外迁移的过程和死亡在3～4天中完成。

图7.23A中模式性的描述代表了一种对结直肠癌发展高度有效的防御机制，既然几乎所有的细胞都存在突变，要起到保护肠壁的责任，就注定要在它们形成之后的数天之内死亡。按照这种逻辑，可导致随后癌症发展的突变就是那些既中断直肠上皮细胞从隐窝向外迁移，且中断不久后发生细胞死亡的突变。结肠的肠黏膜细胞可能获得一种引起它在肠隐窝滞留和生存的突变，这个细胞以及它的后代能够在那里聚集，而且任何它们的后代获得的突变等位基因都将在肠隐窝中被维持，而不

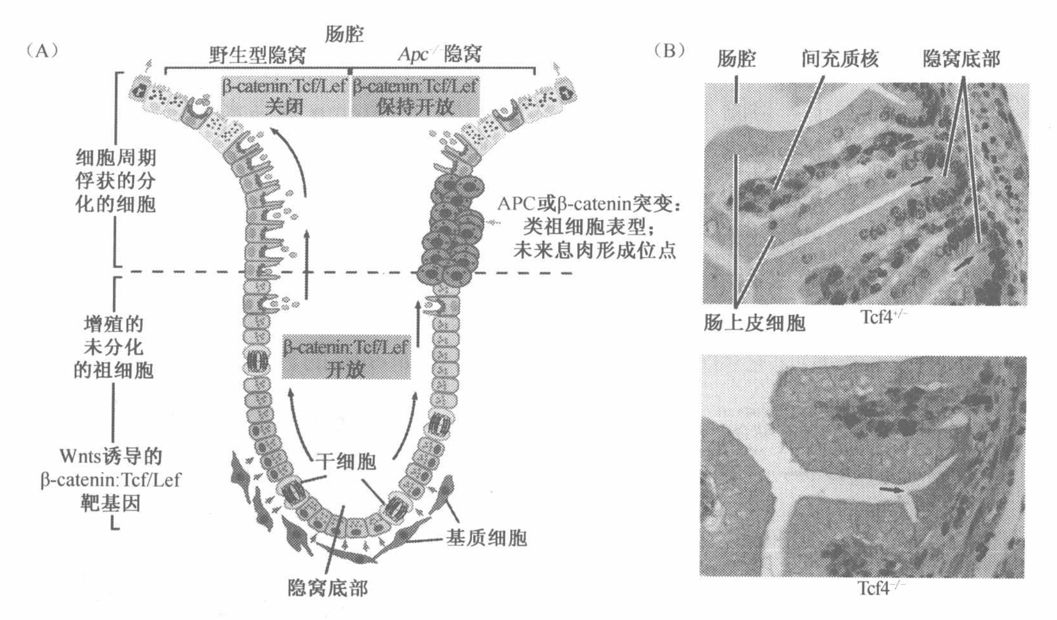


图 7.24 β-catenin 和结肠隐窝的生物学意义 （A）结肠隐窝包含接近底部的具有复制能力的干细胞，表达高水平的 β-catenin（红色的小箭头）。在定位于接近隐窝底部的细胞内，胞内 β-catenin 水平高是由于这些细胞接收了来源于基质的 Wnt 信号（红色，见 6.10 节）。这些 β-catenin 分子迁移至细胞核与 Tcf/Lef 转录因子关联，使这些细胞的增殖能力增加，并阻止了它们分化。在正常的肠道内，这些干细胞的大部分后代向上朝着内腔迁移（隐窝左侧）。由于这样的行为，接收到的 Wnt 刺激减少，导致了 β-catenin 降解的增加，使这些细胞在接近内腔的时候停止增殖，并增加了分化，最终在 3～4 天后进入凋亡（绿色的小箭头）。相反，当 Apc 蛋白缺陷时，β-catenin 的水平保持很高（隐窝右侧），甚至在缺乏强的 Wnt 信号的情况下，细胞仍然保持增殖的未分化的状态（紫色），不能向上迁移，在隐窝中聚集，最终产生一个腺瘤状息肉。（B）接近隐窝底部的干细胞的形成依赖于正常的干细胞中高水平的 β-catenin，以及它能与 Tcf4 蛋白相互作用形成一个激活的转录因子的能力。如图所示，在 $Tcf4^{+/-}$ 小鼠的隐窝底部的上皮细胞（箭头，上边的板块）具有高度的增殖能力（以 Ki67 染色作为证据，这是一个细胞增殖的标志物）。当它们移出隐窝，向上到达肠绒毛的边缘时，丢失了增殖的潜能（在每个绒毛核心的间叶细胞也具有高度增殖的能力，但它们的行为与上皮性的肠黏膜细胞无关）。在 $Tcf4^{-/-}$ 小鼠中（下面的板块）则相反，在隐窝中的肠黏膜干细胞是缺乏的（箭头），完整的肠腔也因此缺乏了上皮细胞的内层。（A，from M. van de Wetering et al.，*Cell* 111：251-263，2002；B，from V. Korinek et al.，*Nat. Genet.* 19：379-383，1998.）

是很快地由于这些后代细胞的凋亡而丢失。这些突变的一部分可推动后代细胞向着肿瘤性生长。

这些动态变化牵涉到控制肠黏膜细胞从结肠肠隐窝向外迁移的分子机制。β-catenin 是这种行为主要的控制因子。从 6.10 节回想起，在细胞内可溶 β-catenin 的水平是 Wnt 生长因子控制的。当 Wnt 结合细胞表面的受体后，β-catenin 可免于被降解，聚集和迁移至细胞核，在那里它结合一个 DNA 结合蛋白基团，命名为 Tcf 或 Lef。形成的异二聚体转录因子还可以继续招募其他核蛋白，形成多个蛋白的复合体，这个复合体激活一系列靶基因的表达，而这些靶基因可形成干细胞的表型（在肠黏膜细胞的情况下）。

在结肠隐窝框架中，肠黏膜干细胞遇到由接近隐窝底部的基质细胞释放的 Wnt 因子，使肠黏膜细胞中的 β-catenin 水平升高（图 7.24）。实际上，这些细胞通过细胞内 β-catenin 的高水平保持于类似干细胞的状态。然而，当这些干细胞的后代开始向上迁移时，这些后代细胞不再接受 Wnt 信号刺激，细胞内 β-catenin 的水平也急剧降低。结

果，这些细胞失去了干细胞表型，离开了细胞周期，分化后进入功能性的肠黏膜。

Apc是结肠腺瘤状息肉基因的产物，负责负调控细胞内的β-catenin水平。在正常肠隐窝底部的细胞中，检测不到*APC*基因的表达，β-catenin则高水平表达。然而，当细胞开始向上迁移出肠隐窝时，Apc在这些细胞中的表达水平大幅度增加，在Wnt缺少的情况下，这些蛋白降低了细胞内β-catenin的水平。

通过已知的Apc作用的分子机制可以很好的解释这种反转的表达。Apc是一个由2843个氨基酸组成的大的蛋白质（图7.25A），与两个骨架蛋白（axin和conduction）一起，形成了一个多蛋白的复合体，结合在一起的还有糖原合成激酶-3β（GSK-3β）和β-catenin（图7.25B）。它们通过GSK-3β磷酸化β-catenin的四个氨基酸残基而关联；

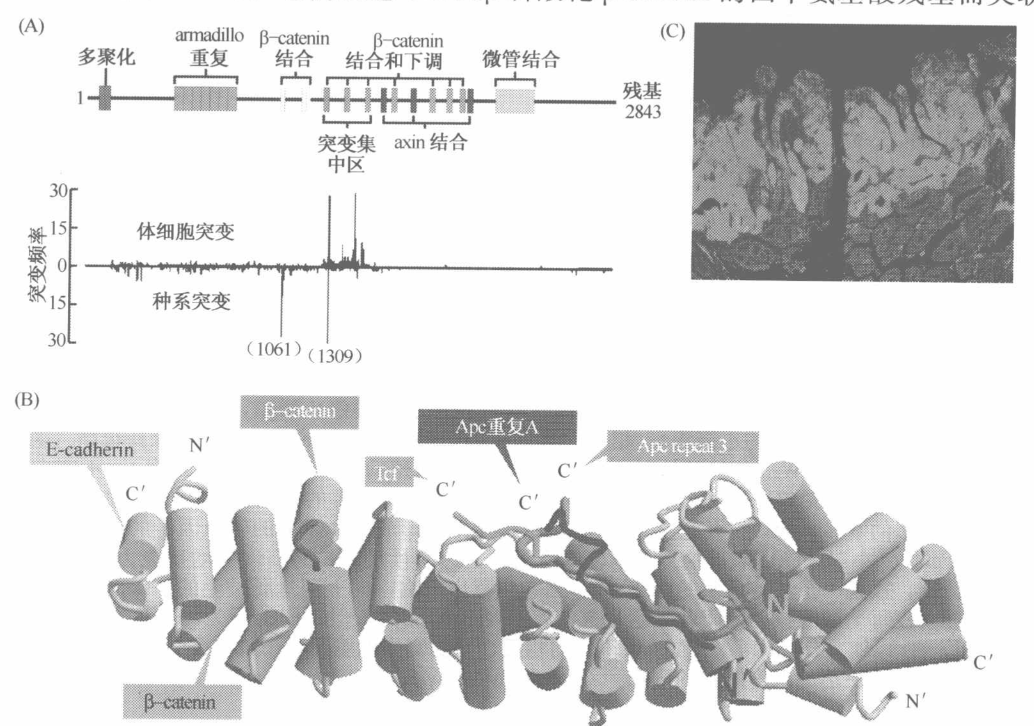


图7.25 Apc、β-catenin和Tcf/Lef （A）图表简要显示了Apc多个结构域的结构（上）与一系列*APC*突变谱和它们发生的位置（下）。（B）β-catenin分子（浅蓝色，灰色圆柱体）在它的生命周期中与很多可变的伴侣蛋白相关。在其合成后，存在于胞质的Apc蛋白的一个结构域（深蓝色，橘黄色）中，这个结构域可以使它被蛋白酶体降解。如果它逃脱被降解，可以使用同一个结构域与一个细胞表面受体E-cadherin（黄色）的胞质部分结合，如同我们在第13和14章所了解的。β-catenin可以迁移至细胞核中，在那里与Tcf/Lef转录因子（绿色）的一个结构域相关联，激活了一系列靶基因的表达。很显然，所有这三个β-catenin结合的伴侣分子具有相似的可与β-catenin结合的结构域特征。（C）在家族性息肉的Min小鼠模型中，通过一个化学突变方法将一个失活的点突变引入小鼠*APC*基因中。携带该突变等位基因的染色体区域在肠隐窝的一些细胞中发生了LOH，产生了缺乏Apc活性的细胞。在这些细胞中，β-catenin不再被降解，积累至很高的水平，进入细胞核，在那里与Tcf/Lef转录因子作用，使促进细胞生长的基因表达。结果产生了一个过度生长的克隆，如这里可见的腺瘤，使用免疫标记的方法可以看到β-catenin（粉红色，上部），而所有细胞的胞核，包括那些正常的隐窝的细胞（下部），可以看到是蓝色的。（A，from P. Polakis，Biochim. Biophys. Acta 1332：F127-F147，1997 and adapted from R. Fodde et al.，Nat. Rev. Cancer 1：55-67，2001；B，courtesy of H. J. Choi and W. I. Weis，and from N.-C. Ha et al.，Mol. Cell. 15：511-521，2004；C，courtesy of K. M. Haigis and T. Jacks.）

这种磷酸化可导致β-catenin经由泛素化-蛋白酶体途径被降解（信息栏7.8）。总之，Apc对于激发β-catenin降解是必需的，而且在它缺少的情况下，β-catenin在细胞内积累至很高的水平。

信息栏7.8　蛋白酶体的泛素化降解　很多胞内蛋白的浓度是受一系列生理信号紧密调控的，这种调控往往是通过对这些蛋白选择性的降解来实现的。因此，在某种特定条件下，某种蛋白可以保持长久的活性从而得以在细胞内累积，而在另一种特定的生理信号的调节下它可能被迅速降解。这种降解通常是通过泛素-蛋白酶体来完成的（表7.3）。

表7.3　泛素调节的蛋白降解的优点

A. 单向的——与蛋白的磷酸化和其他的翻译后修饰不同，降解不能被迅速逆转
B. 快速的——大量的蛋白能在数分钟之内被迅速降解
C. 精细调节——为重要的调节蛋白提供了另一种精细的调节方式
D. 定位——能够被限制在特定的亚细胞组分
E. 特异性——小部分蛋白被降解而不影响其他的蛋白的功能

很多蛋白的降解都是由于关键位点上的氨基酸被某种蛋白激酶磷酸化而引起的。氨基酸磷酸化的结果是其与邻近的氨基酸残基相互作用，将一个与泛素分子共价结合的蛋白酶吸引到该蛋白上来——这就是**泛素化**过程（通常称为泛素蛋白化）。另外一个可能的机制则是，当一个蛋白正常隐匿的亚单位被暴露时，即使在没有特异位点被磷酸化作为标志的情况下，同样可以吸引某种泛素复合体。

泛素是一个小分子蛋白（由76个氨基酸残基组成），从单细胞真核生物到哺乳动物其序列都高度保守；人和酵母的泛素蛋白相比，76个氨基酸残基中只有三个不同（因其在生物中广泛表达而得此名）。第一个泛素分子通过其C端的谷氨酸残基与靶蛋白含有赖氨酸残基的侧链相连接；第二个泛素分子则与第一个泛素分子第48位的赖氨酸相连接，以此类推，从而形成一条泛素化分子链(图7.26)。靶蛋白就以该链为分子标志物，依据降解的蛋白酶的定位，向核内或细胞质移动（另一种形式的泛素链，是泛素单体通过第63位的赖氨酸残基连接而成，功能主要是激活标记蛋白而不是诱导其降解）。

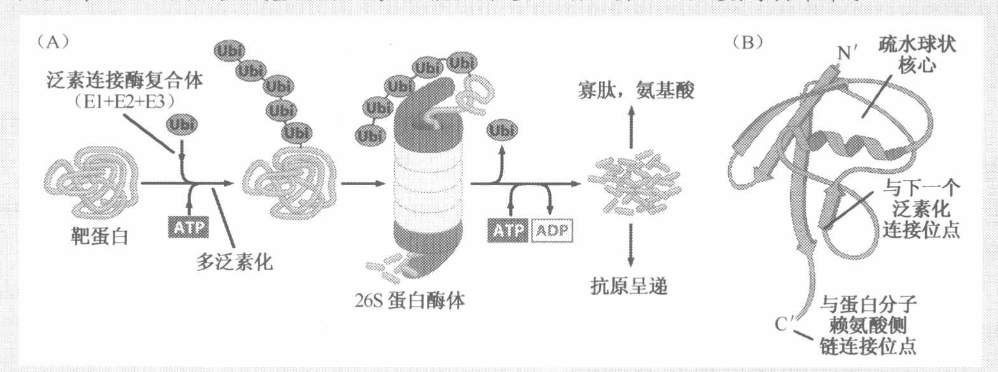


图7.26　泛素化和蛋白酶　哺乳动物细胞中很多蛋白的降解都是通过泛素化-蛋白酶体途径。(A) 三个蛋白的复合体（E1＋E2＋E3），共同组成一个泛素连接酶，识别将被降解的蛋白并以泛素链标记该蛋白（Ubi）。被多聚泛素化后，该蛋白被传送到蛋白酶体处（图7.27），在那它将被去泛素化并被降解成寡肽，并被进一步降解为氨基酸或用于免疫系统的抗原提呈(15.3节。事实上，蛋白的抗原提呈是由特定的蛋白酶所执行的)。(B) 泛素分子是仅由76个氨基酸残基构成的相对较短的蛋白分子，它的序列和结构在所有的真核细胞中都高度保守。图示为X射线下的晶体结构。

对人体基因组近20 000个基因的序列分析显示，至少有527个基因可能编码E3泛素连接酶——主要是用来识别将被泛素化降解的底物蛋白，从而验证了这种蛋白降解机制的普遍重要性；另外尚有110种基因可能编码去泛素蛋白酶。

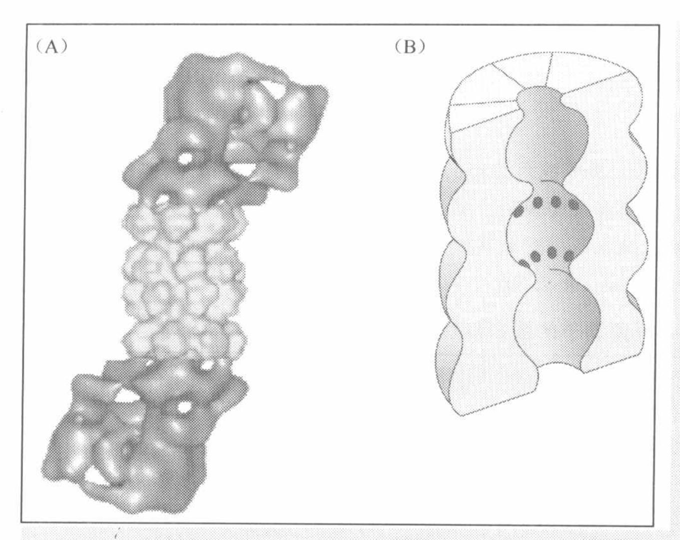


图 7.27 蛋白酶体 蛋白酶体是由约30种不同蛋白组成的分子质量为2.5MDa的复合体。(A) 由X射线下的晶体结构产生的蛋白酶体结构示意图，图中所示两端为“杯状”结构域（紫色），与泛素蛋白结合，使其去泛素化，并介导蛋白进入中心的“桶状”结构域（黄色），在这里蛋白被裂解为寡肽或氨基酸残基。(B)“桶状”结构域的简略图，横切面上显示了蛋白自动裂解发生的区域（红点所示）。(A, from W. Baumeister et al., Cell 92: 367-380, 1998.)

蛋白酶体是细胞内对蛋白进行降解的工厂。蛋白酶体是一种由多个蛋白亚单位所构成的大分子镂空的圆柱状复合体，先利用ATP将靶蛋白展开，再利用圆柱体内部结构对其进行降解（图7.27)。多泛素化的蛋白被介导进入蛋白酶体之后，首先是去泛素化，然后被消化成为3～25个氨基酸残基大小的多肽片段。

泛素化是已知的多种短暂激活的生长调节蛋白的主要降解方式，如Myc、p53、Jun和某些细胞周期蛋白（第8章)，在哺乳动物细胞中超过80%的蛋白是通过蛋白酶体的方式降解的。但目前已知较多的是多泛素化标记的蛋白降解，而单泛素化蛋白降解机制（仅有一个泛素相结合）则比较复杂且知之甚少。目前较为清楚的是单泛素化主要存在于特定的组织细胞中，与细胞的内吞作用，蛋白的分类及其核内运输，甚至可能与调节基因的表达有关。例如，对p53肿瘤抑制蛋白的单泛素化标记有利于其向核外转运，随后被多泛素化标记进入蛋白酶体降解途径。单泛素化的生长因子受体都是通过内吞作用被标记的。泛素分子还可以与其他数十个不同的蛋白共同组成更大的复合体（如泛素样的Sumo和Nedd蛋白)，它们所标记的靶蛋白主要是参与代谢而非降解。

在已知这些信息的前提下，我们可以发现*APC*基因失活在结肠隐窝内的重要性。总结人类结直肠癌中*APC*突变谱（图7.25A)，我们可以看到很多突变会导致Apc蛋白翻译的提前中止，从而去除了β-catenin和axin的结合区域，以及可导致β-catenin降解的区域。

很显然，在大约90%的散发性结直肠癌中发现β-catenin的积累是*APC*失活的重要的结果。这种积累现象也适用于剩下的较少的（估计为10%）携带有野生型的*APC*基因拷贝的散发性结直肠癌。这些病例的部分个体中，*APC*基因启动子区被超甲基化而抑制转录。在其他个体中，编码β-catenin的基因携带点突变，导致突变的β-catenin分子丢失了可以被GSK-3β磷酸化的残基，既然不能被磷酸化，这些突变的β-catenin分子逃离被降解的命运，并在细胞内积累——与Apc丢失时得到的结果一致。

当β-catenin在肠黏膜细胞前体中由于Apc功能的失活或其他机制而积累时（图7.25C)，导致它们维持了一种类似干细胞的表型，使它们不能迁移出肠隐窝，随后又使肠隐窝中大量相对未分化的细胞积累（图7.24A)，最终发生腺瘤状息肉。同时，这

些堆积的细胞后来能够维持更多的突变，这些突变使它们形成更多前述的息肉，随后再产生更多的突变，导致癌的发生。

这个模型解释了最终导致人类结直肠癌细胞的突变的发生次序。这些突变最初都与Apc功能的失活有关（或者功能上等同于以上提到的改变）。最终的细胞，都被陷在肠隐窝中，然后经历一定数量的其他基因的突变，例如K-*ras*（4.4节），从而导致了这些细胞更有侵略性地生长。重要的是：Apc-β-catenin通路的改变总是最初发生，而后来的遗传学改变的次序是可变的。

近来的研究发现了另外一个完全没有预料到的Apc丢失的情况：缺乏Apc功能的细胞会发生明显的染色体不稳定性（CIN），从而导致染色体数量上的增加或减少，这通常是由于在有丝分裂过程中染色体的不恰当分离造成。一些Apc阴性的细胞甚至积累了4倍的（或接近4倍的）染色体核型，这样的细胞中大部分染色体以四倍体而不是通常的两倍体存在。这种缺陷是对以上描述的Apc胞浆功能的补充，这时Apc分子分布在微管束中，形成有丝分裂的纺锤体，在有丝分裂后期和末期负责染色体分离。由于这些染色体分离缺陷导致了非整倍体的产生，从而改变了关键的促使生长和抑制生长的基因的比例，这些改变进一步促进了肿瘤的发生，加速使癌前病变的细胞获得了明显的基因型然后是表型的改变。

7.12 脑视网膜血管瘤病：pVHL调节缺氧反应

脑视网膜血管瘤综合征是一种可以发展成多种肿瘤的遗传性疾病，包括肾透明细胞癌，嗜铬细胞瘤（肾上腺细胞来源）和中枢神经系统及视网膜的**成血管细胞瘤**（血管瘤）。几乎所有该综合征的患者都有*VHL*抑癌基因的种系突变。*VHL*等位基因似乎在人类基因库有一定的突变频率，导致该疾病在人群中的发生率约为1∶35000。和*Rb*等位基因突变一样，*VHL*的等位基因突变也是属于人常染色体显性遗传。此外，和*Rb*相似的是，*VHL*也存在杂合子的丢失，从而导致在$VHL^{-/-}$的肿瘤患者中所遗传的是一个变异的种系*VHL*等位基因。

*VHL*基因的失活也发生在大部分（约70%）散发的肾癌患者中。在这些散发的肿瘤患者中该基因的失活并不是由*VHL*等位基因的突变所引起的，而通常是由该基因启动子的甲基化引起转录沉默所导致。pVHL是*VHL*基因的产物，它的主要功能是促进一个关键性转录因子——低氧诱导因子（HIF-1）一个亚单位的破坏。

在正常的氧压下，pVHL促进HIF-1的α亚单位的降解，导致HIF-1α在合成之后被迅速降解，其半衰期仅为10min。从而使HIF-1在细胞内以非常不稳定的形式存在，以保持失活状态，因此功能性的HIF-1转录因子是由两个必要的亚单位（HIF-1α和HIF-1β）所组成（图7.28）。

这种蛋白合成之后紧接着迅速的降解被称为“无效循环”。但当细胞在低氧环境下这种特殊的循环将被打破（异常氧压），在这种情况下，HIF-1将不再被降解，从而在几分钟内得以迅速增加（半衰期和浓度都增加10倍以上）。功能性的HIF-1转录因子复合体的形成导致了一系列靶基因的表达，而这些靶基因的产物都与血管形成（形成新的血管）、红细胞生成（产生红细胞）、能量代谢（主要是糖代谢）以及糖原合成有关。

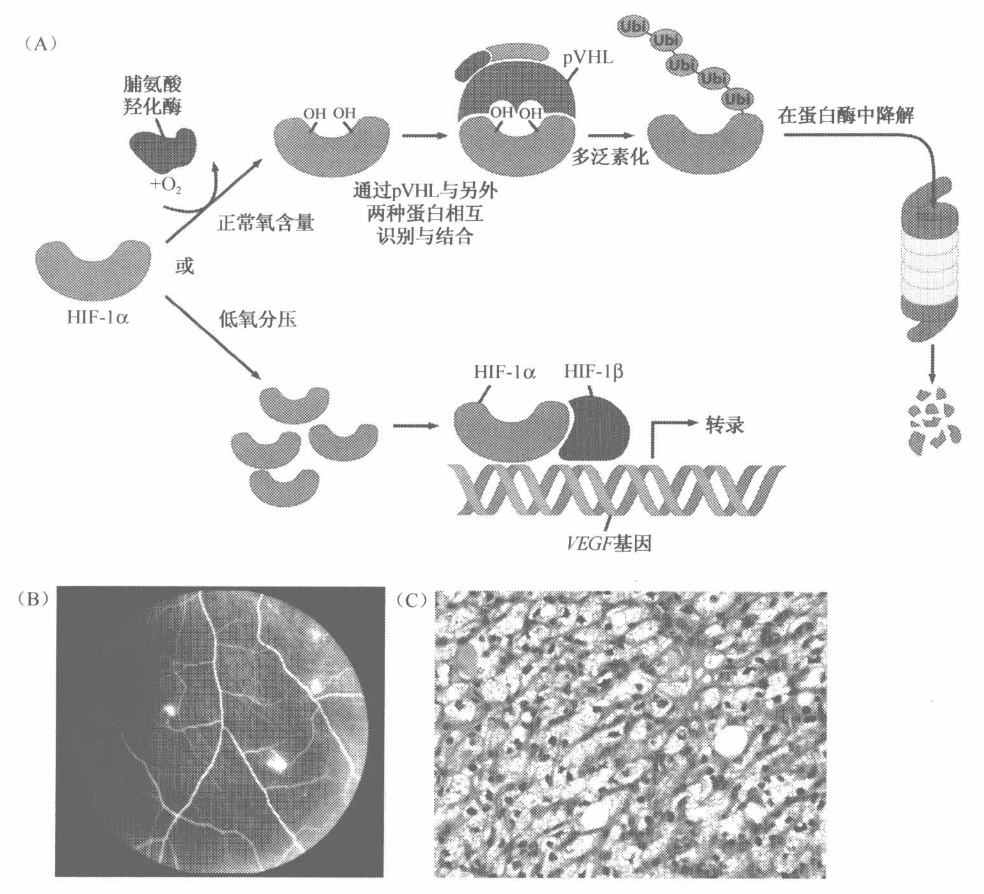


图 7.28 HIF-1 及 pVHL 对它的调节 （A）低氧诱导的转录因子-1（HIF-1）是由两个亚单位所组成，HIF-1α 和 HIF-1β，两者共同作用产生转录激活功能。在正常的氧压下（上图所示），HIF-1α（蓝色）高效合成的同时因为 pVHL（红色）的激活而被迅速降解。在这些条件下，脯氨酸羟化酶（棕色），一种含铁蛋白酶，负责氧化 HIF-1α 的两个脯氨酸残基（此处被标以氧化基团）。氧化的脯氨酸在另外两种蛋白的辅助下（分别示以紫色和绿色）可以促进 pVHL 和 HIF-1 的结合，通过泛素标记 HIF-1 使其降解。但是，在缺氧条件下（下图所示），脯氨酸羟化酶不能使 HIF-1α 的两个羟基被氧化，pVHL 无法与 HIF-1α 结合，HIF-1α 逃逸泛素化，因此得以迅速累积。从而使 HIF-1α 能够与 HIF-1β（棕色）形成异源二聚体，进一步激活很多生理情况下的重要基因的转录，像血管内皮生长因子（VEGF）基因（如第 13 章中所描述，VEGF 是血管生成的重要诱导因子）。（B）von Hippel-Lindau 综合征的症状之一就是视网膜上不可控制的血管化，此处图示为大的白点；这主要是因为 pVHL 功能的丧失导致 VEGF 在细胞内过度表达。（C）pVHL 功能的丧失最严重的后果是由 VEGF 诱导前内皮细胞增生所形成的成血管细胞瘤。（B and C，courtesy of W. G. Kaelin Jr.）

其生理作用是诱导蛋白的合成，使细胞在短时间的缺氧环境下能够存活，并且在较长的时间内能为细胞提供较为充足的氧气。显而易见，后一种作用主要是在蛋白的协同作用下，在缺氧组织内产生新的血管。就像我们将在后面描述的一样（13.6 节），新的血管形成对于肿瘤的产生也是至关重要的，能为肿瘤组织输送氧气和营养物质，同时带走二氧化碳和代谢产物。

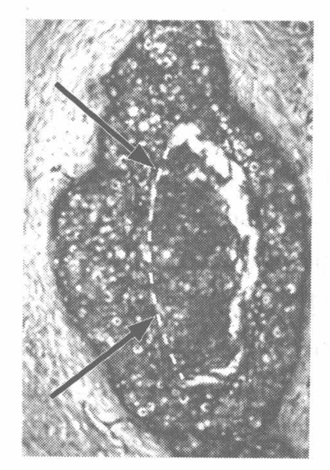
HIF-1 在调节血管形成过程中的重要性在于它诱导了一系列基因的表达，这些基因

主要编码血管内皮生长因子（VEGF），血小板来源的生长因子（PDGF）以及转化生长因子 α（TGF-α）以及其他一些相关的基因。VEGF 可以刺激组成新血管的内皮细胞的生长；PDGF 可以促进内皮细胞和相关的间充质细胞，如周细胞和成纤维细胞的生长；而 TGF-α 可以促进包括表皮细胞在内的多种细胞的增生。低氧条件下的肾组织，HIF-1能够诱导编码红细胞生成素（EPO）的基因表达，导致了红细胞生成素在血循环中的迅速增加，从而促进红细胞在骨髓中的生成（详见信息栏 6.2 和 6.8 节）。

回述到 *VHL* 的功能，它的产物 pVHL，与其他蛋白共同组成复合体存在于细胞中。它们的共同作用是捕获一个泛素分子并将其与特异的底物蛋白共价连接起来（信息栏 7.8）。正如此章前面所提及，一旦某个蛋白分子被多泛素化标记以后，它通常就会被运输到蛋白酶体复合体上而被其降解。在这个多蛋白复合体内，pVHL 负责识别和结合 HIF-1α，然后将其他促进泛素化的蛋白连接到这个复合体上。

只有在 HIF-1α 两个脯氨酸残基中的一个被氧化成羟基脯氨酸时，pVHL 才能与 HIF-1α 结合；当缺乏羟基脯氨酸时，pVHL 不能与 HIF-1α 结合，从而使 HIF-1α 逃避降解。HIF-1α 的脯氨酸可以被一种活性依赖于氧含量的酶转化成羟基脯氨酸。一旦 HIF-1 的脯氨酸被羟基化，它可以插入到 pVHL 疏水核心的间隙中，从而使 pVHL 结合 HIF-1α 并激发它的降解，进而使 HIF-1α 转录因子所诱发的基因转录被阻断（图 7.28A）。

总而言之，从这些事实我们可以推论 pVHL 在正常细胞中的作用和其在肿瘤组织中失活的原因：在正常的氧压下（含氧量正常），HIF-1α 两个羟基脯氨酸中的一个或两个同时被 pVHL 所识别，导致其被迅速降解。在缺氧的条件下，HIF-1α 失去羟化脯氨酸，不能被 pVHL 所结合，得以在细胞内大量积累并执行 HIF-1 转录因子的功能。这样，就使其能够在包括正常和肿瘤在内的所有缺氧组织中激活 VEGF 的表达（图 7.29）。



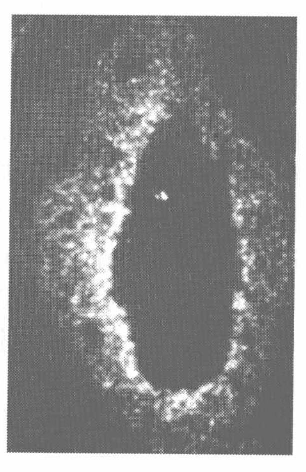


图 7.29 HIF-1 靶蛋白 VEGF 的表达 HIF 所激活的靶基因中包括了编码 VEGF 的基因（血管内皮生长因子；图 7.28A）。这里显示的是（左图）在人类乳腺原位癌中，即肿瘤组织局限于原发部位未累及到间质阶段，在肿瘤的中心部位有大量的坏死细胞（箭头所示）。利用原位杂交方法（右图）揭示了 VEGF 的 RNA 表达（白色区域）在肿瘤组织中从外侧缘氧含量丰富的部位向中心氧含量减低的部位逐级增加。由于肿瘤组织中心部位的氧含量已不足以维持细胞的存活，这就解释了为什么该部位有大量的坏死细胞，以及 VEGF 的 mRNA 不再被检测到。(Courtesy of A. L. Harris.)

尽管很多肿瘤都与 *VHL* 等位基因突变有关，但 pVHL 蛋白在单个的癌细胞中并未被发现。而在其他一些肿瘤中，更多精细的改变将导致 pVHL 的失活而不是影响其表达水平。例如，点突变可能影响 pVHL 识别和结合 HIF-1α 羟化脯氨酸疏水性口袋中的

氨基酸残基。通过其他的一些机制也可导致 HIF-1α 转录因子的激活从而驱动一系列生长促进基因的表达，包括上述的 VEGF、PDGF 和 TGF-α。此过程促进了很多种具有相应受体的细胞的增殖。从而最终导致一种或另一种肿瘤的发生。此外，肿瘤细胞还可导致 VEGF 在血液循环中的含量增加，因为 VEGF 具有刺激骨髓产生红细胞的功能，这就解释了为什么有些 Hippel-Lindau 疾病的患者红细胞计数会异常增高。

然而，上述有关 pVHL 作用的描述仍然不能解释其功能失调所引起的所有表型（信息栏 7.9）。可以明确的是，pVHL 具有与 HIF-1α 降解有关的其他作用。例如，缺乏活性的 pVHL 的细胞不能正确组装细胞外基质中的纤维连接蛋白，并且，有确切的报道称 pVHL 可以结合细胞内的纤维连接蛋白。此外，大量的 pVHL 还与胞浆微管的稳定性密切相关。这些目前机制尚未明确的现象提示 pVHL 对这些细胞反应的调控可能与细胞的氧压并无关系。

信息栏 7.9　家族性的红细胞增多症也可能与 VHL 的缺陷有关　令人奇怪的是，*VHL* 基因上存在一种特异的种系点突变，这种突变可以导致 pVHL 与 HIF-1α 结合减弱，从而导致家族性的红细胞增多症而非 Hippel-Lindau 综合征。这种疾病是由于高于正常水平的 HIF-1α 引起红细胞生成素（EPO）明显增高，最终导致大量红细胞的产生。因此，通过这种特殊的 VHL 变异仅仅对 HIF-1α 其中一个已知的靶基因作用的现象，揭示了 VHL 肯定还可以通过其他一些未知的方式来影响 HIF-1α 某些特异的靶基因的启动子。

7.13　总结与展望

抑癌基因组成了一个庞大的基因家族，它们的蛋白产物调节了多种细胞生理学功能。如表 7.1 所示，这些蛋白存在于细胞的各个部位，它们有一个共同的属性，那就是：无论如何，这些基因的正常功能是，减少身体某种组织产生在临床上可以检测到的肿瘤的可能性。

在大部分的病例中，抑癌基因双等位基因失活才能使前体的肿瘤细胞获得增殖和存活的能力。但是，也有少部分例外，如 *Nf1* 基因，当其中的一个拷贝失活以后，即可引起细胞的过度生长，即单倍剂量不足现象。另外，在第 9 章中，我们还将讲述另一个抑癌基因 *p53*，通过其中一个等位基因的突变而影响同一个细胞中另一个野生型等位基因的功能，进而改变细胞的表型。

抑癌基因的发现帮助我们了解了人类肿瘤生物学中一个主要的问题——家族性的肿瘤综合征。就像本章讲述的一样，遗传了这些抑癌基因中的某一个有缺陷的等位基因，可以有正常的胚胎发育。这个遗传缺陷的表型可以被延后很多年才表现出来，有时甚至到了中年以后，最终由有活性的野生型的等位基因的缺失和某种肿瘤的产生来揭示这种改变。这些野生型等位基因的缺失往往是由于杂合性缺失（LOH）而引起的；并且通过对一组肿瘤中某一特定的染色体区域的重复观察，往往可以发现该区域内一种新的未知的抑癌基因的失活。事实上，在肿瘤细胞基因组中已经发现了大量染色体区域发生杂合性缺失，只是迄今为止，只有很小的一部分抑癌基因被克隆出来。这就意味着实际存在的抑癌基因远远不止表 7.1 所罗列的那几个。

这些基因的行为多样性为肿瘤研究带来了更大的困难：什么才是评判一个抑癌基因的标准呢？在本书的开始，我们将抑癌基因归纳为一组其产物对抑制细胞的增殖和存活有一定作用的基因超家族。但另外还有一些基因，它们是通过维持基因组的稳定性和抑制基因突变来间接地阻止肿瘤的发生，具体机制我们将在第12章中详细描述。从一个遗传学家的角度来看，将这两种基因看成是基因组的“看门神”和“守护者”这两个角色是武断的观点，因为在癌细胞的基因组中，通常可以发现这两种基因的野生型的消失或失活。此外，肿瘤综合征的遗传模式也与此处所描述的一致，与有缺陷的持家基因相关。并且，对于研究肿瘤形成的生物机制的人们而言，抑癌基因（看门基因）和基因组稳定性维持基因（看护基因）的区别非常重要，这也是为什么那些对肿瘤的病因学感兴趣的研究者如此重视它的原因。

当最先发现的抑癌基因（*p53* 和 *Rb*）被克隆出来时，很多其他基因就被冠以抑癌基因“候选者”的名称，因为它们在肿瘤组织中的表达相对于正常的组织往往有明显的减少或缺失。用这个标准来评价抑癌基因超家族的成员很快就被人们意识到存在着缺陷，很大程度上是因为在研究中发现这种评判标准不足以识别某些肿瘤的前体细胞。某些类型的肿瘤可能不表达某种特定的基因，因为这种基因的表达只在正常的组织分化过程中发生，而已经产生肿瘤细胞的该组织中不再经历这种分化过程。因此，在肿瘤细胞中缺乏这种基因的表达可能仅仅反映了一种正常的分化过程未能完成而不是该基因的病理性缺失。因此这种仅以基因表达缺失为准则的评判标准不具备说服力。

在某些实例中，确实存在某种抑癌基因的候选者在可以被明确认定为将发展成为肿瘤细胞的前体正常细胞中表达，而在肿瘤细胞中缺失。这将会为这种基因被认为是抑癌基因提供更强有力的证据。但是，既然目前此证据尚不明确，并且在某种肿瘤细胞中基因表达的缺失通常只是导致细胞转化众多原因中的一个而不是其根本原因。那么，这种基因的失活也许在致瘤细胞的形成过程中并没有起到任何作用。

相对于评论家而言，研究者对他们所感兴趣的抑癌基因已经开展了相关的功能实验研究。尤其是他们已经将克隆的野生型抑癌基因导入到完全缺失该基因表达的肿瘤细胞系中。这样做的目的是一旦该野生型的抑癌基因的功能在这些肿瘤细胞中得以恢复，这些细胞就可以被部分或是完全地逆转成正常的生长表现型，甚至进入凋亡阶段。但是，由于这些实验当中还伴随着很多基因的**异位表达**，因此尚不能对此做出更合理的解释——这些基因在正常情况下并不表达，而只在有外源基因导入的宿主细胞中表达，并且它们在这些细胞中的表达往往达到一个很高的水平，从而使得细胞停止生长甚至死亡。很多种基因的导入都可以引起这种现象的产生，但这些基因却从来没被认为是抑癌基因。

因此，当某个基因在肿瘤细胞中表达缺失，而导入该基因并使其达到正常生理水平时则可抑制肿瘤细胞生长，并在相同组织来源的正常细胞中其表达不受影响时，在确定该基因是否能被称为抑癌基因时，所做的功能测试将更加严格。这将为其参选抑癌基因提供更具有说服力的证据。但是，即便是这样，由于上述所提到的种种困难致使这些实验结果往往难以区分与所研究的肿瘤细胞具有相似的生物学特性的正常细胞。

作为确定某个预测的候选的抑癌基因的遗传学标准，这些双关性的功能实验是十分必要的。如果某个基因在肿瘤细胞的基因组中反复发生 LOH，那么它作为抑癌基因的候选资格将会变得可靠得多。但目前有太多不确定的因素。毕竟，即便一个基因反复发生 LOH，它也可能仅仅是与同一染色体上某个真正的抑癌基因密切相关的基因，而这个抑癌基因将在肿瘤发展过程中成为真正的缺失靶位。

这些顾虑使我们提出了更为严格的抑癌基因的定义：只有当某个基因在很多种肿瘤细胞基因组中都发生 LOH，并且导致了该基因的纯合子发生明确的失活变异，该基因才能被称为抑癌基因。(后面提到的这种标准即可排除那些在人类染色体上仅仅是与真正的抑癌基因相关的其他基因。)

毫无疑问，即使是这些称得上苛刻的遗传学标准仍然存在缺陷，因为它们排除了某些特定的，有可能是真正的抑癌基因。考虑到有很多抑癌基因是由于启动子的甲基化而失活（7.8 节）。在这种情况下，即便是该基因已经被有效的沉默掉，在肿瘤细胞的基因组中其等位基因的突变却很少发生。如此说来，如依据 *Runx3* 基因的生物学行为，它可以被认为是一种抑癌基因。因为到目前为止，它的功能沉默完全与其在很多肿瘤细胞中的甲基化有关（由于目前尚无肿瘤相关基因 *Runx3* 失活变异的报道，导致其功能定位尚不明确)。通过敲除小鼠的候选抑癌基因而使其失活（信息栏 7.10）为确定其是否为抑癌基因提供了另一种很有用的方法。虽然小鼠和人类在生物学上有很多方面的差异，但是，同样是作为哺乳动物应具有基本相同的生物学特性，从而使实验小鼠作为人类肿瘤生物学模型在很多方面成为可能。

表 7.1 中所罗列的几乎所有的基因都能在同系繁殖的小鼠中被敲除。从而在很大程度上，使杂合子展示出可以增加一种或另一种肿瘤发生的可能性。在很多实例中，受到影响的某种组织与在人体上所观察到的存在很大的区别。例如，*Rb* 杂合子的小鼠（即 $Rb^{+/-}$）往往发展成为垂体肿瘤而不是视网膜母细胞瘤——这个结果令人感到非常奇怪，在人体和鼠类靶细胞群之间存在着如此大的类型和生长动力学之间的差异。但是，如果在这种遗传学变异的小鼠身上有任何一种肿瘤发生的频率增高的话，都可以为该基因成为候选的抑癌基因提供有说服力的证据。

所有这些解释了为什么在为该基因家族的成员建立提名标准时需要考虑如此多的因素。对于我们而言，也许最令人信服的标准是就其功能而言：一个候选的抑癌基因是否能称得上是真正的抑癌基因主要是看它所编码的蛋白的生物学活性，以及在细胞周期调节中是否能够抑制肿瘤的活性。

总而言之，在确认候选的抑癌基因时各方面的考虑都来源于一个中心事实：一个抑癌基因存在的意义只有在其缺失时才能表现出来。这就给对它的各项研究带来了很多方面的困难。而这些困难又进一步阻碍了将来对肿瘤特异糖蛋白的确认。

即便并不是所有的方面都已明确，但在实验阶段我们仍然可以为抑癌基因确立一些基本的标准。首先，我们为该基因的命名，在一定意义上，是个误称。它们正常的作用是抑制细胞数量的增加，或者是抑制增生和促进凋亡。如果它们缺失，细胞在适宜的时间和条件下的存活和增生将受到一定程度的影响（图 7.31)。

信息栏 7.10　同源重组重建小鼠种系　同源重组的方法可以在人为改变小鼠种系时应用。运用电穿孔和显微注射的方法将一个基因片段导入体细胞或胚胎干细胞（ES）中是可以实现的，这些导入的基因片段将与宿主细胞染色体上的同源 DNA 序列发生重组，即使这种频率很低但仍然可以发生有意义的同源重组。运用合适的选择标记，例如 neo^r（新霉素抗性基因）和 tk^{HSV}（疱疹病毒胸腺嘧啶脱氧核苷酸激酶基因，能提高细胞对甘希洛韦细胞毒作用的敏感性），可以用来筛选细胞群中小部分发生了同源重组的亚克隆（图 7.30A）。因此，用新霉素可以筛选出稳定克隆，而甘希洛韦则可以将未稳定转染供体 DNA 而仍保留了 tk^{HSV} 敏感性的胚胎干细胞（ES）杀灭（图 7.30B）

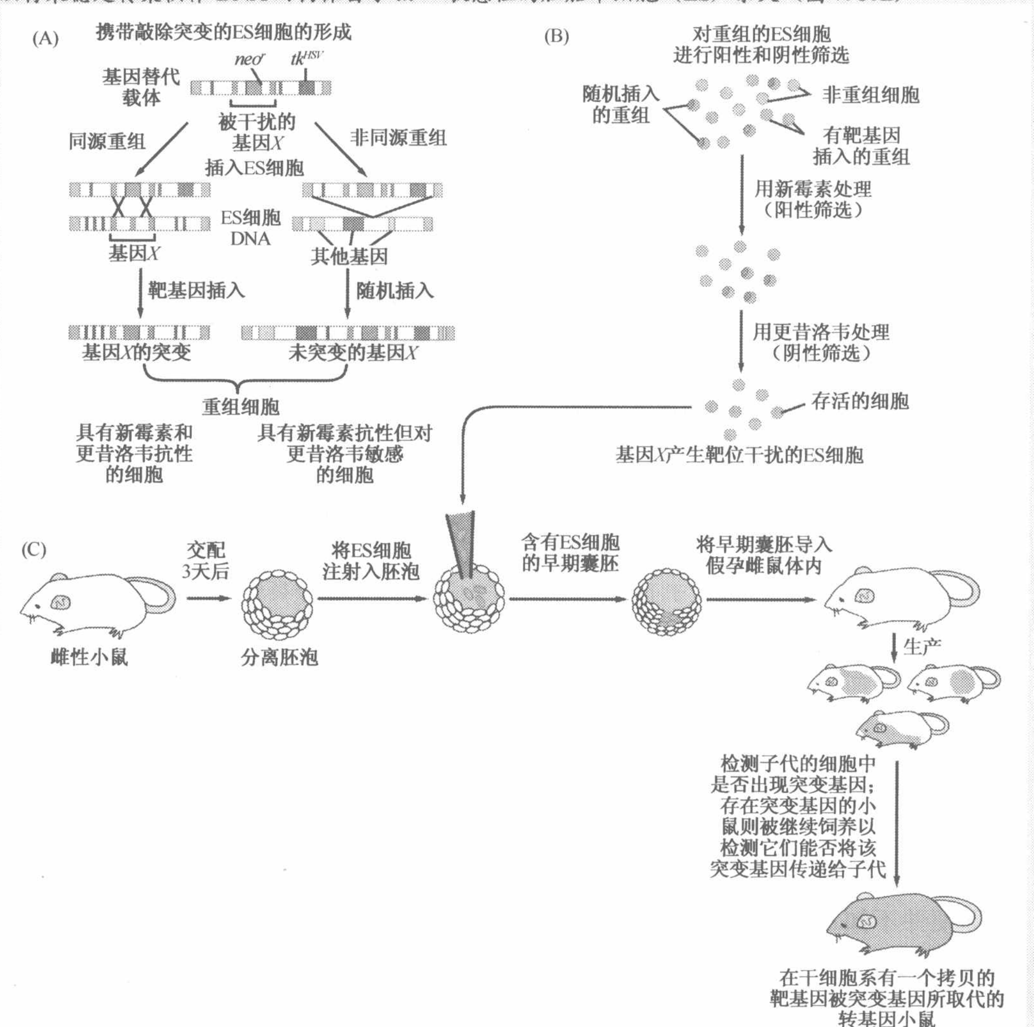


图 7.30　小鼠种系基因的同源重组　（A）小鼠某个基因的克隆片段与 neo^r 和 tk^{HSV} 药物选择标记通过 DNA 重组的方式连接。其中 neo^r 标记用于选择已稳定转染了 DNA 克隆片段的细胞，而 tk^{HSV} 标记则筛选出那些通过非同源重组获得 DNA 克隆片段的细胞。这些克隆的 DNA 片段可以通过电击或转染的方式被导入小鼠的胚胎干细胞。（B）药物抗性选择可以用来筛选通过同源重组获得稳定 DNA 克隆片段的 ES 细胞。被导入到小鼠基因组中的 DNA 的构象可以通过 Southern 定量分析（未显示）的方式检测。（C）ES 细胞携带适量整合的 DNA 片段被注入小鼠的囊胚中，它们的子代将嵌入被转染的囊胚组织中。新生小鼠的干细胞中则将有可能携带被导入的 DNA 片段，从而使该 DNA 片段通过种系繁衍的方式遗传给下一代。（A and B，adapted from H. Lodish et al.，Molecular Cell Biology，5th ed. New York：Freeman，2004；C，adapted from B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.）

由于同源重组而获得克隆DNA的ES细胞可以通过显微注射的方式被导入到小鼠**囊胚**（早期胚胎）的**囊胚腔**中，然后这个囊胚可以被导入一只**假孕**的雌鼠体内（图7.30C）。由于ES细胞是**全能性**的（可以分化出身体各个组织的细胞），所以被注射的细胞可以插入到发育的组织中，从而通过**遗传镶嵌**的方式，使下一代小鼠中一部分细胞和组织来源于供体细胞的分裂后代，而另一部分则来源于宿主胚胎的囊胚细胞。这样的话，这些转基因的ES细胞又可以产生子代并继续插入到发育的生殖腺中，导致生殖腺中的干细胞通过成体交配传到下一代，最终导致子代有机体的等位基因发生符合实验设计的改变。

最初应用的供体DNA片段保留原有的序列，但当与染色体基因发生重组以后，干扰了染色体基因的功能，这个程序就被命名为“基因敲除”。另一方面，在显微注射之前还可以通过其他方式改变克隆的供体DNA片段。通过同源重组，目的基因能够保持一定水平的功能和表达。例如，它可以正常表达一个变异的蛋白甚至一个外源蛋白；这样一种将新的序列导入原有基因的方式通常称为“基因敲入”。

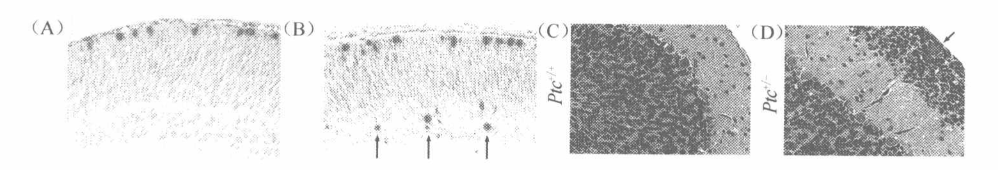


图7.31　在分化过程中pRb对增殖的抑制　一个有功能的抑癌基因的出现或缺失在调控细胞增殖和组织发育过程中有着深远的影响。(A) 在小鼠肾正常的发育过程中，肾前体细胞的增殖被限制在发育中的肾上层（棕褐色的点所示），而在下层中已形成的细胞进入有丝分裂的后期，即分化阶段。在此例中，通过使用一种只在增生的细胞中显示的针对组蛋白H3的抗体来检测细胞的增殖情况。(B) 在遗传改变的小鼠中，其*Rb*基因选择性地在肾内发生双等位基因失活，在发育的肾组织中位于下层的细胞，本来应该处于有丝分裂后期，此时却持续增殖并丧失了适当的分化（箭头所示）。而在人体中，相似的现象出现在视网膜细胞中。(C) 在一只正常发育的野生型小鼠小脑中，外层（右）的颗粒细胞（深紫色）迁移至内层（左），在这种小鼠体内，含有两个野生型的*Ptched*（*Ptc*）抑癌基因；这些细胞将进入有丝分裂的后期。(D) 但是，在$Ptc^{+/-}$杂合子中，很多颗粒细胞仍停留在发育组织中的外层（箭头，红色星号所示）并持续增殖；这些细胞将成为小儿脑瘤的前体细胞，这是在人类儿童脑瘤中最常见的一种。（A and B，from D. MacPherson et al.，Genes Dev 18：1681-1694，2004；C and D，from T. G. Oliver et al.，Development 132：2425-2439，2005.）

即便并不知道所有肿瘤特异性糖蛋白的共性，有一个基本特点是很明显的：抑癌基因的蛋白产物并不形成单一的完整的信号通路。取而代之的是，这些蛋白在细胞的不同部位执行各种调节功能，并共同构成一个错综复杂的信号网络。在本章的开头我们即用简单明确的理论解释了这一现象：所有设计良好的调控系统都有正性和负性的调节组分来互相制约和平衡对方。因此，所有的正性调节信号，如那些通过促有丝分裂信号通路而起正性调节的信号，必然同时存在负性的调节信号，确保这些正性调节受到合理地限制。也许肿瘤生物学家应该远在实验室研究抑癌基因之前就从第一原则中推断出这些。现在看来，当时他们未能向电气工程师和那些对电子控制电路和控制论的复杂性驾轻就熟的人请教真是一大憾事。而这些人有可能很早就能预测抑癌基因的存在。

即便另外 50 多个抑癌基因也被编入目录，pRb 和 p53 仍然会被认为是在人类肿瘤病因学中最重要的两个抑癌基因的产物。在接下来的两章中我们会进一步阐明其原因。尽管现在尚无充分的证据证明这一观点，但越来越多的事实表明由 pRb 和 p53 所调控的两条信号通路在绝大多数的肿瘤中出现下调。而其他所有的抑癌基因（表 7.1）仅仅只在人类某一种类型的肿瘤发展过程中发挥作用。

抑癌基因在肿瘤细胞基因组中表达缺失这一事实让我们提出一个大胆的假设：如果我们能在肿瘤细胞中表达缺失的抑癌基因，那么有可能部分甚至完全恢复正常细胞的表型，从而使肿瘤这个难题得到很大程度上的改善。这种“基因治疗”还可以从另一个方面来检测抑癌基因，如果我们将一个抑癌基因通过偶然的、不经意的方式导入到正常细胞中，那么该基因在生理表达水平时应该不起任何作用。这样就减少了对正常组织产生意想不到的细胞毒作用。

虽然理论上基因治疗很有前途，但实际操作起来却困难重重。很多核心步骤中都需要的病毒载体还不能将完整的、野生型抑癌基因的克隆传递至肿瘤组织的赘生细胞内。但是，一旦能够将这种野生型的基因拷贝转染到肿瘤细胞群中的每一个细胞，就能给治愈肿瘤带来希望；如果大多数的细胞不能获得这种以载体为媒介的抑癌基因，那么这些细胞将会作为肿瘤复发的潜在起源。基于这个原因，即便已知抑癌基因对于我们认识肿瘤病因学有如此重要的作用，在治疗实践上对这个认知的匮乏仍然需要我们进行更深入地研究和探讨。

不过这种令人沮丧的局面也有例外，目前研究发现抑癌基因的缺失可以使细胞对某些小分子质量的药物敏感（对那些贯穿整个肿瘤发生发展过程的细胞更有效）。例如，在肿瘤进展过程中，某些类型的肿瘤细胞将会特别依赖于抑癌基因功能缺失后产生的信号。例如，*PTEN* 抑癌基因的缺失导致 Akt/PKB 的高活性，这种现象称为 mTOR，对肿瘤有很大的治愈前景，像胶质细胞瘤和前列腺癌，这些肿瘤中 PTEN 的活性往往缺失。但是一般情况下，就像我们将在第 16 章中提到的一样，目前药物开发和抗肿瘤治疗的主要进展都是围绕阻断癌蛋白的高活性来开展的。现在只能寄望于我们对抑癌基因多方面的认知将可以作为将来抗肿瘤治疗发展的基础，到那时我们将会拥有更为精湛纯熟的新治疗技术。

重要概念

- 在细胞水平，肿瘤的表型通常是隐性的（需要有重要的癌基因的表达，在肿瘤的发生过程中起着至关重要的作用）。这就表明，遗传信息的缺失对肿瘤细胞的表型至少起了一定的作用。
- 有功能的、重要的遗传信息的丢失有很大一部分与抑癌基因的缺失有关（TSG），因为这些基因在肿瘤细胞中常表现为失活或为无效等位基因。
- 因此，往往只有当一个细胞中抑癌基因的双等位基因都缺失时才会影响到细胞的表型。
- 抑癌基因功能的丧失常常发生于遗传变异或由于启动子甲基化而引起基因的表观遗传沉默。

- 抑癌基因一个等位基因的失活（通过变异或甲基化）常常会启动另一个等位基因通过其他的方式失活；这些机制依赖于抑癌基因所在的染色体上的杂合性缺失（LOH），并且还常常包含有丝分裂重组、染色体上抑癌基因所处区域的丢失、异常染色体分离（偶联的染色体不分离），或者是 DNA 复制时模板链发生基因转换。
- LOH 的发生频率常较突变或启动子的甲基化高，在不同的基因中其发生频率不同。
- 如果一个染色体上重复发生 LOH，并可以独立地提高肿瘤的发生率，常表明此区域内存在抑癌基因。
- 抑癌基因可以通过很多生化机制来调节细胞的增殖。它们的共同点是任何一个正常功能的丧失将导致细胞向肿瘤转化的可能性增加。
- 当发生突变时，抑癌基因等位基因的缺陷将来源于种系细胞的遗传，这将大大增加机体对某种特殊类型肿瘤的易感性。
- 抑癌基因常被称为“看门基因”（gatekeeper）以表明它们在调控细胞增殖中的重要性，并以此与另一种被称为“看护基因”（caretaker）的基因类型相区别，这种基因也是在遗传了有缺陷的形式时明显增加了罹患肿瘤的风险性，但是在机体内两者发挥着完全不同的功能，后者通常是维持细胞基因组的完整性。
- 在肿瘤发生过程中抑癌基因缺失的发生频率明显高于原癌基因被激活成癌基因的频率。

思考问题

1. 为什么在遗传性突变中，家族性肿瘤综合征只有一小部分是由激活的癌基因所引起，而大部分由于遗传了有缺陷的抑癌基因所导致？
2. 什么因素决定了在每代细胞中抑癌基因失活的频率高于癌基因的激活？
3. 在细胞生物学水平，抑癌基因功能的丧失与癌基因活性的获得有什么不同？
4. 在已知类型的肿瘤中，发生 LOH 的抑癌基因少于 20%，为什么如此低频率的 LOH 却在分子水平上增加了识别和分离这些基因的复杂性？
5. 在将某个基因归类于抑癌基因时需要什么样的标准？
6. 哪些因素将影响确定组织是否受到了遗传的有缺陷的抑癌基因等位基因作用？

参考读物

Baylin SB & Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 16, 168–174.

aylin SB, Herman JG, Graff JR, et al. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 72, 141–196.

Bienz M & Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311–320.

Cichowski K & Jacks T (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104, 593–604.

Comings DE (1973) A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3324–3328.

Fearon ER (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 215, 252–259.

Feinberg AP & Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* 4, 143–153.

Fodde R, Smits R & Clevers H (2001) *APC*, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67.

Gregorieff A & Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 19, 877–890.

Herman JG & Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N.E. J. Med.* 349, 2042–2054.

Hershko A, Ciechanover A & Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nat. Med.* 6, 1073–1081.

Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.

Jones PA & Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068–1070.

Kern SE (2002) Whose hypothesis? Ciphering, sectorials, D lesions, freckles and the operation of Stigler's Law. *Cancer Biol. Ther.* 1, 571–581.

Koch CA, Vortmeyer AO, Zhuang Z et al. (2002) New insights into the genetics of chromaffin cell tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 970, 11–28.

Kondo K & Kaelin WG Jr (2001) The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene. *Exp. Cell Res.* 264, 117–125.

Laird PW (2003) The power and promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 3, 253–266.

Lustig B & Behrens J (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129, 199–221.

Marsh DJ & Zori RT (2002) Genetic insights into familial cancers—update and recent discoveries. *Cancer Lett.* 181, 125–164.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV & Kaykas A. (2004) Wnt and β-catenin signaling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 689–699.

Nelson WJ & Nusse R (2004) Convergence of Wnt, β-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.

Ponder BA (2001) Cancer genetics. *Nature* 411, 336–341.

Pugh CW & Ratcliffe PJ (2003) The von Hippel–Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Sem. Cancer Biol.* 13, 83–89.

Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.

Shtiegman K & Yarden Y (2003) The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Sem. Cancer Biol.* 13, 29–40.

Tischfield JA and Shao C (2003) Somatic recombination redux. *Nat. Genet.* 33, 5–6.

Vogelstein B & Kinzler KW (1998) The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill.

Voges D, Zwickl P & Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015–1068.

Wijnhoven SW, Kool, HJ, van Teilingen, CM et al. (2001) Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation? *Mutat. Res.* 473, 23–36.

Zhu Y and Parada LF (2001) Neurofibromin, a tumor suppressor in the nervous system. *Exp. Cell Res.* 264, 19–28.

（刘芝华　田妍妍　苑　怡　贺　欢）

第 8 章　成视网膜母细胞蛋白（retinoblastoma protein，pRb）与控制细胞周期的定时钟

人们很容易提出这样的疑问：既然它们的存在可能带来如此巨大的灾祸，为什么在细胞转化过程中还要维持它们的存在呢？合乎逻辑的回答就是：它们的存在在细胞周期的某些阶段或者胚胎发育过程中，能够起到不可替代的作用。

David E. Comings，遗传学家，1973 年

机体全身单个细胞的命运，被其周围环境中存在的各种信号左右——这一观点在前面的章节中反复强调。因此，几乎所有类型的正常细胞的增殖都必须在促有丝分裂生长因子（mitogenic growth factor）的促进作用下进行。然而，其他信号蛋白，尤其是转化生长因子（transforming growth factor-β，TGF-β）可以抑制促有丝分裂因子的信号传递，终止细胞的增殖过程。另外，细胞外信号可以诱导细胞进入**有丝分裂期后**的时期——细胞分化期。进入这个时期，细胞将不再增殖。

这些功能各异的信号被各种独立的细胞表面受体收集并传递给细胞质中复杂的信号处理通路。有些时候，这些混杂的信号必须被处理、整合，并最终形成简单的、二元的命令，如决定细胞是继续增殖还是保持休眠，或者决定静止细胞是否进行分化。这些生物行为提示，在细胞内部存在一些中央行动调节器——一种专门的信号交换所，接收各种输入信号并做出重要的指令，决定相关细胞的命运。这些重要的调节器已经被鉴定，它们是在细胞核中发挥作用的细胞周期定时钟。这个名字存在一个误导，因为这个“时钟”并不能用来计算时间，然而，在更好的称谓产生之前，我们将继续沿用这一名词。

这些**细胞周期定时钟**是一些相互作用的蛋白质网络——一种信号传递通路，它们接收胞内和胞外的各种不同来源的信号，对它们进行整合，然后决定细胞的命运。如果细胞周期时钟支持细胞增殖，它将整合一些复杂的信号转换因子形成细胞增殖和分裂的周期；如果时钟支持细胞静止，它将通过信号因子使细胞保持非增殖状态（图 8.1）。

肿瘤细胞的增殖行为表明，细胞命运的调节器不仅受到正常蛋白的影响，而且受到许多致癌基因编码蛋白的干扰，它们插入不同的信号通路中，破坏正常的细胞调控机制。同样，关键的肿瘤抑癌基因蛋白的缺失也能导致调控通路的改变，因此，它们同样能影响细胞周期时钟的决定。必然的，所有癌基因和抑癌基因的分子作用也应该以它们对细胞周期时钟的影响来解释。至此，我们将用本章的前半篇幅来阐述这一分子机制的正常运转机理，然后继续探讨在人类肿瘤细胞中它是如何被干扰的。

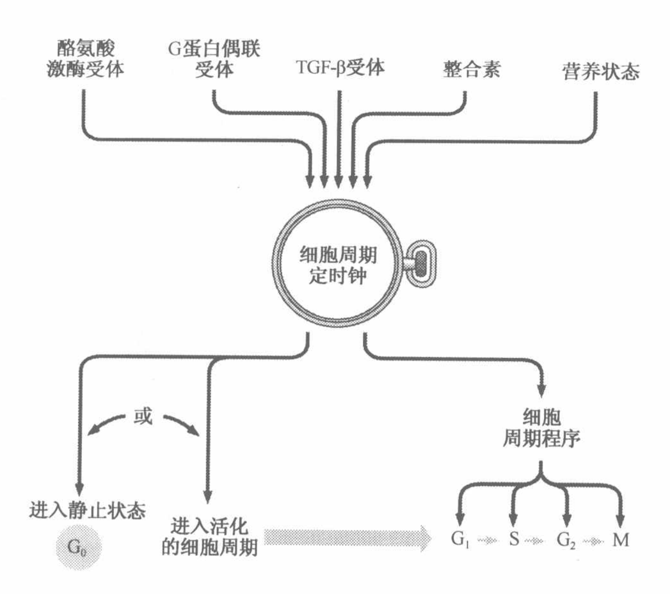


图 8.1　细胞增殖生长的中央调节器　“细胞周期的定时钟”是指在细胞核中发挥作用的分子通路，它通过整合胞内和胞外的各种不同来源的传入信号，决定细胞是否进入活化的细胞周期，或者退回到非增殖的状态。在决定细胞增殖时，这一信号通路通过胞内的一系列生化改变，使细胞内容物复制并一分为二成两个子代细胞。

8.1　外部信号影响细胞进入活化的细胞周期

在促进指数生长的培养条件下，哺乳动物细胞经历一个复杂的生长和分裂周期，即**细胞周期**。一个经过细胞分裂——**有丝分裂**和**胞质分裂**新近生成的子代细胞，必须马上决定是否进入下一个新的生长分裂周期，或者退回到非生长状态，即我们之前命名的 G_0 期。如前所述（5.1 节和 6.1 节），细胞的这一决定受到其周围的促有丝分裂生长因子的强烈影响，足够浓度的生长因子将刺激新生成的细胞维持在活跃的生长-分裂周期内，而生长因子的缺失将触发细胞从有丝分裂进入 G_0 期，即静止状态。

培养基中的生长抑制因子也能促使细胞退出细胞周期，在这些抗有丝分裂因子中，转化生长因子（TGF-β）具有显著性作用。不论是因为促有丝分裂生长因子的缺乏还是由于抗有丝分裂因子（如 TGF-β）的存在，细胞从细胞周期进入静止的 G_0 期的过程都是可逆的，因此，处于静止的细胞在添加促有丝分裂生长因子后可以被诱导返回细胞的生长分裂周期。然而，有些细胞离开有活性的细胞周期是不可逆的，从而失去了所有返回细胞生长分裂周期的可能，这种情况被称为有丝分裂期后，如大脑中存在的许多种类的神经元都属于这一范畴。

通过细胞分裂新近形成的细胞要维持在有活性的生长-分裂周期中，需要这些细胞即刻开始准备下一次分裂，这些准备必须包括细胞内大分子成分的复制，以确保下次分裂形成的两个子代细胞能够获得相等的成分。这种细胞成分的累积导致细胞体积的增加，被界定为细胞的生长过程，与细胞的分裂过程相区别，后者是指通过有丝分裂和胞质分裂，一个亲本细胞形成两个子代细胞（图 8.2）。然而，更普遍的用法以及本书通篇使用的“细胞生长”一词，包含细胞成分的累积以及随后的细胞分裂，也就是说这两个过程都被包括在细胞增殖之内。

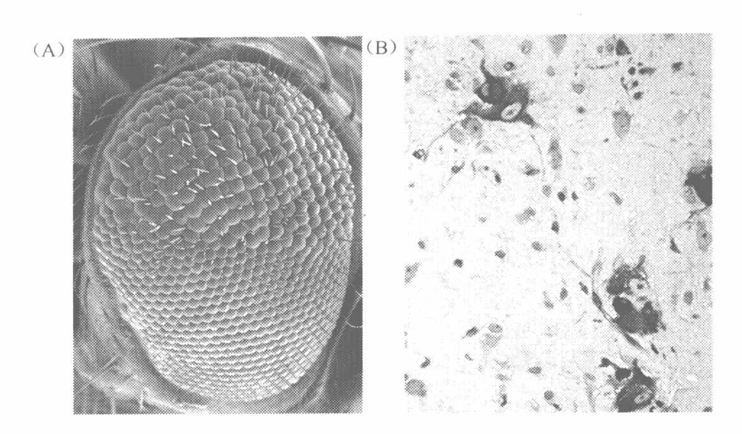


图 8.2 生长与增殖的比较 特定信号蛋白的变更推进细胞生长和分裂的进程，如 TSC1 肿瘤抑制基因编码蛋白。(A) 在果蝇眼的电子显微镜扫描图中，眼睛上部的小眼细胞已经丧失了 TSC1 的蝇同源蛋白，这些细胞体积大于野生型细胞（下部），因为它们在细胞周期中更大程度的生长，并且形成其自身的结构。(B) 同样的生物学行为在结节硬化症患者的大脑中发现，通过遗传性变异以及随后体细胞中杂合子的丢失，导致 TSC1 的功能缺失，其间可见巨细胞形成的良性瘤（结节）。这些巨细胞（棕色）被抗磷酸化 S6 抗体标记，S6：一种核糖体蛋白，在调控蛋白合成以及细胞生长中发挥重要作用；在 TSC1 功能缺失的细胞中，S6 磷酸化以及其功能的激活失去调控。(A，from X. Gao and D. Pan，Genes Dev 15：1383-1392，2001；B，courtesy of J. A. Chan and D. J. Kwiatkowski.)

细胞成分的累积除了许多其他分子，还包括细胞基因组的复制。在许多原核细胞中，这种 DNA 的复制过程在子代细胞形成之后马上开始。然而，在大多数哺乳动物细胞中，细胞大分子的所有合成程序是截然不同的。RNA 与蛋白的累积在细胞分裂之后随即开始并且持续整个细胞分裂周期；与之不同的是，在细胞有丝分裂和胞质分裂形成子代细胞之后开始的 DNA 复制通常要延迟几个小时（12～15h）。这个子代细胞形成与 DNA 开始复制的间隙被命名为细胞周期的 G_1 期（第一个间隙）（图 8.3）。在这一时期，细胞要做出生长还是维持静止的决定；对于静止细胞，要决定细胞是否分化。

在许多种培养的哺乳动物细胞中，DNA 的合成通常需要 6～8h 来完成。DNA 合成的时期被称为 S 期，此期间的时长由细胞 DNA 的含量部分决定（约等于 6.4×10^9 碱基对每二倍体基因组），在此时限内，DNA 被精确地复制。S 期的实际时长在不同种类的细胞中是各不相同的，在某些特定的细胞中，如快速分裂的胚胎细胞和淋巴细胞，其 S 期时长非常短。

经过 S 期后，细胞被认为应该直接进入有丝分裂期（M 期）。然而，大多数哺乳动物细胞在进入 M 期之前都有一个 3～5h 的延迟，这是细胞周期中的第二个间隙，称为 G_2 期。在 G_2 期，细胞呈现一些目前我们还不能完全理解的细胞形态，为进入 M 期和细胞分裂做准备。M 期的完成通常大约需要 1h，包括 4 个独立的亚期：**前期**、**中期**、**后期**、**末期**，并最终完成胞质分裂，即细胞质的分离，形成两个新的子代细胞。尽管对体外培养的哺乳动物细胞的研究能够普遍观察到这些时相，但是这也不能完全反映在所

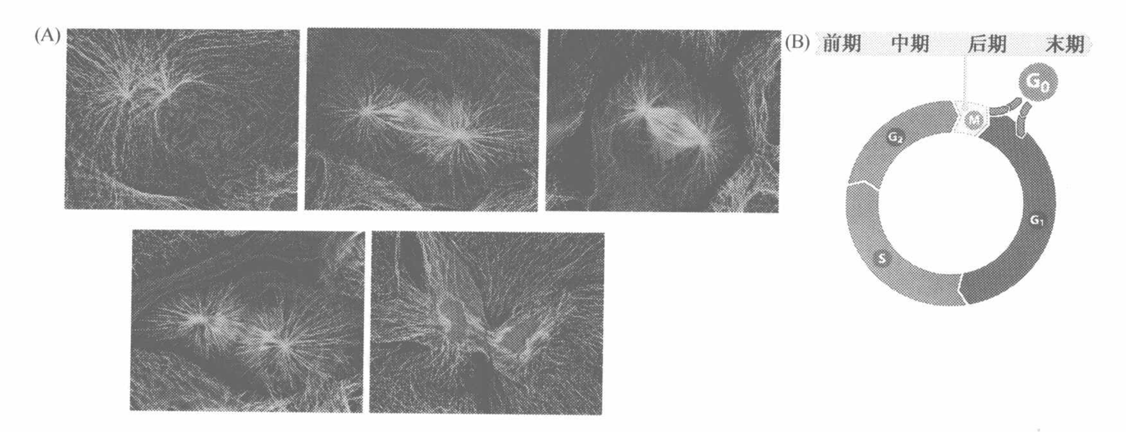


图 8.3 哺乳动物细胞周期 （A）东方蝾螈肺细胞的免疫荧光染色显示有丝分裂（M 期）的 4 个不同亚期（从上至下）。分裂间期（包括 G_1、S、G_2 期）不可见的染色体（蓝色）在有丝分裂前期开始浓缩聚集，显微镜下可见；同时，位于细胞两极的中心体（放射状的亮绿体）开始组装（前两张图）。有丝分裂中期，染色体在细胞中间的平面排列，并且附着于有丝分裂纺锤体的微管纤维（亮绿色，第三张图），与此同时，核膜崩解消失。有丝分裂后期，染色体的两个姐妹染色单体在纺锤体的牵引下分离，向细胞的两极移动（第四张图）。在有丝分裂末期，染色体形成两束后（第五张图），姐妹染色单体开始解聚，新的核膜在染色单体周围形成（此刻开始被称为染色质）。这 4 个亚期共同组成有丝分裂期。在这些亚期之后，细胞进入胞质分裂期（有时也被认为是末期的一部分），亲本细胞的胞质分裂，形成两个子代细胞。（B）哺乳动物细胞的生长-分裂周期被分成 4 个时相——G_1、S（DNA 复制）、G_2、M（有丝分裂）。第五个时相 G_0 期，是指细胞退出活性的细胞周期而处于非增殖的静止状态。尽管细胞从活性的细胞周期退出而进入 G_0 期在此处被描述成发生在 G_1 期之前，其在 G_1 期的实际发生时间并不清楚（A，from Conly Rieder.）

有条件下的所有类型细胞的生物学行为，例如，活跃增殖的淋巴细胞其倍增时间需要 5h，而有些早期胚胎细胞的倍增甚至更快。

与 S 期一样，M 期的进程也需要非常精确。M 期从每条染色体中新近复制的两条 DNA 螺旋开始，它们形成姐妹**染色单体**，在细胞核中互相毗连。姐妹染色单体在 M 期的分配必须准确无误以保证生成的两个子代细胞能够精确地平均分配一条染色单体，不多也不少。当染色单体进入新分裂形成的子代细胞核区后，这些染色单体就变成新生细胞的染色质。

这意味着基因组的遗传物质分配到子代细胞必须严格执行两个过程——S 期基因组的精确复制以及 M 期复制的 DNA 准确分配到子代细胞中，任何一个过程的缺损将导致细胞和组织的损伤，并可能导致肿瘤，这一点将在下文中做进一步讨论。

与所有的机制一样，细胞周期中每一步的执行都有可能发生故障，而细胞周期对细胞的重要作用要求细胞周期的每一步都准确无误，因此，细胞还需要具有一系列的监控机制来监督细胞周期的每一步，保证在上一步成功完成之后细胞周期才能进入下一步；如果周期中特定步骤发生错误，监控机制马上中止细胞周期的进程，直到这个错误被修正。然而有些监控机制用于确保某些特定步骤在一个细胞周期中完成后就不再重复，直到细胞进入下一个细胞周期，这些监控机制被命名为**检测点**或**检测点调控**（checkpoint

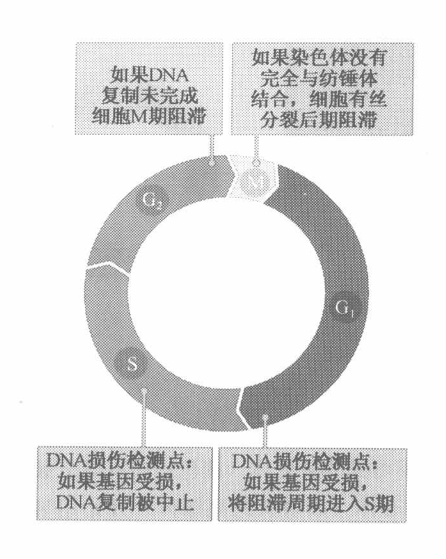


图 8.4　细胞周期中检测点举例　检测点强化了质量控制以保证细胞周期进入下一个循环前各时相的每一必须步骤都准确完成。细胞在 G_1 期各步完成之前不能进入 S 期；细胞将被阻滞进入 G_2 期直到所有染色体 DNA 完成复制。同样，细胞将不能进入有丝分裂后期（成对的姐妹染色单体分离）直到中期的有丝分裂纺锤体与所有染色体正确组装；如果细胞的 DNA 受到损伤而没有被修复，细胞将不能进入 S 期或 M 期。有些检测点控制（图中未显示）确保某些特定步骤在一个细胞周期中完成后就不再重复，直到下一个细胞周期。

or checkpoint control)（图 8.4）。

当细胞的基因组需要修复时，检测点能够保证细胞不会从 G_1 期进入 S 期；而在 S 期发挥作用的检测点，能够因 DNA 损伤而减慢或者中止 DNA 的复制过程（在哺乳动物细胞中，这一作用可能导致 DNA 的复制时间加倍）；还有一些检测点能够阻断细胞周期从 G_2 期进入 M 期直到 S 期 DNA 的复制全部完成。DNA 损伤能够触发某些检测点调控阻断细胞进入 M 期。在 M 期，高效能的检测点调控能够将周期进程阻断在有丝分裂后期，直到所有染色体都附着到有丝分裂纺锤体上。还有其他一些检测点调控已经被报道。例如，在 G_2 晚期，解链检测点（decatenation checkpoint）能阻止细胞进入 M 期直到 S 期复制的 DNA 螺旋已经互相解链。由于它们在细胞染色体上发挥的作用，有些检测点调控的缺陷能够被观察到（图 8.5）。

这些检测点的运行也能对肿瘤的形成产生影响。随着肿瘤发展（通常称为肿瘤的进展，具体论述见 1.1 节）的进程，从实验中获得多种具有不同等位基因突变体的初始肿瘤细胞被用于研究具体哪些基因给它们提供了最强的生长优势。细胞基因组的突变率增加提高了它们获得生长优势等位基因的可能性，从而加快了肿瘤发展的步伐。这些基因组的突变率以及随之产生的基因组不稳定性与正常细胞周期的进程是不相容的，因为细胞周期检测点能够阻断那些细胞 DNA 受损或者染色体混乱的细胞周期的进程。因此，除了改变生长调控基因（如活化的癌基因和失活的抑癌基因），许多类型的肿瘤细胞具有一个甚至多个检测点调控的失活。由于这些调控的缺失，初始的肿瘤细胞能够更快累积突变的基因并改变染色体核型，从而推进肿瘤的发生发展。检测点调控对维持细胞基因组稳定性具有重要作用，其功能障碍将在第 12 章重点阐述。

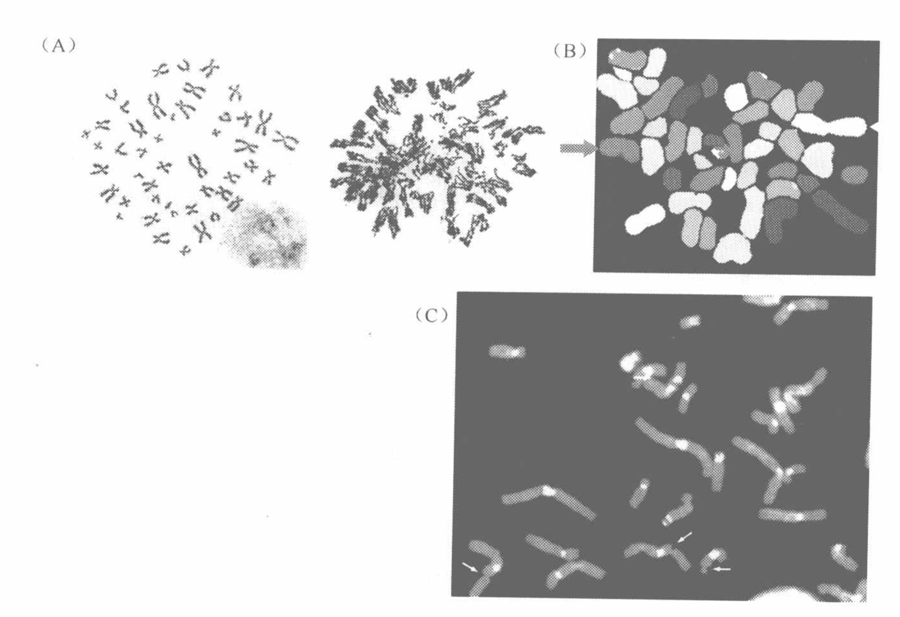


图 8.5　检测点调控缺陷导致的后果　细胞周期关键检测点调控的缺失能够导致细胞核型的改变。(A) 正常细胞核型（左）与缺失 Rad17 检测点蛋白的细胞核型（右）比较，Rad17 参与阻断已经复制的染色体 DNA 在核内重复复制。(B) 正常 Bub1 蛋白在染色体未完成其赤道板列队时阻断姐妹染色单体的分离。Bub1 缺失，细胞的染色体增多或丢失，如光谱核型（spectral karyotyping，SKY）分析所示，此人类细胞只有一条 1 号染色体（黄色，右上箭头所示）和一条 6 号染色体（红色，左中箭头所示）。(C) ATR（ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein）激酶能够阻断 DNA 继续复制直到中断的复制叉修复完成。ATR 缺失，染色体上的脆性位点——染色体上特定位点容易断裂——在核型分析中可见。如图所示，缺失 ATR 的细胞其 13 号染色体和 16 号染色体上的脆性位点明显（白色箭头所示）。(A，from X. Wang et al.，Genes Dev. 17：965-970，2003；B，from A. Musio et al.，Cancer Res. 63：2855-2863，2003；C，from A. M. Casper et al.，Am. J. Hum. Genet. 75：654-660，2004.)

8.2　G_1 期的特定时相决定细胞生长或者维持静止状态

如前所述，机体内几乎所有种类的正常细胞需要外部的信号，如细胞在生长和分裂前都需要促有丝分裂生长因子转化的信号刺激。唯一例外的例子来源于非常早期的胚胎细胞，它们能够不接受特异的生长刺激而持续增殖（信息栏 8.1）。对于我们全身正常组织细胞的这种生物行为，唯一的理论解释是：既然这些细胞参与机体组织的精确构成，它们的增殖必须与组织中邻近细胞相一致，而机体不可能决定组成其自身的每一个细胞的生长和分裂，如果不依赖此调控机制，机体将导致混乱。

信息栏 8.1　胚胎干细胞表现的高度自主行为　我们对正常哺乳动物细胞生物行为的认识受到几十年来研究存在于胚胎和成体组织中各种分化细胞的局限，然而，存在于非常早期胚胎中的细胞其生长遵循完全不同的规律。Rb 蛋白通路和本章阐述的细胞周期定时钟机制在所有种类的成

体细胞中分别发挥作用。相反，许多实验结果表明，Rb蛋白参与的生长调控在早期胚胎细胞中不起作用，其中包括体外培养的胚胎干细胞。相同的机制被称为p53通路（见第9章），似乎终末分化细胞的增殖所必需的促有丝分裂信号对于培养的胚胎细胞的增殖生长并不必需。例如，除抑制细胞分化的生长因子LIF（leukemia inhibitory factor，白血病抑制因子）之外，小鼠胚胎干细胞的体外增殖能够通过其内部产生的信号推动（实际上，组成性激活Ras样蛋白——E-Ras，被报道在这些细胞中发挥特定的作用）。

胚胎干细胞仿佛保留了很多与多细胞生物的祖先——单细胞生物相似的生物行为，这些生物行为是指细胞的生长和存活不依赖来自于周围其他细胞的信号。能证明其高度自主性的有力证据是：当在成体器官的许多解剖部位引入胚胎干细胞时，它们能够形成良性肿瘤（**畸胎瘤**）。既然这些细胞在遗传学上是野生型，它们代表了野生型细胞具有致瘤性的唯一范例。

在过去25年的研究成果表明，细胞受控于其周围的胞外环境以及有活性的细胞周期的个别时段产生的生长调控信号，也就是指从 G_1 期开始直至整个 G_1 期，终止于 G_1-S期转换前的1h或2h（图8.6）。研究表明 G_1 期决定生长的机制与其对培养细胞的胞外信号的反应有关，如果在 G_1 期完成80%～90%以前撤除培养细胞的血清和生长因子，这些细胞的生长周期将不能继续完成，它们将最有可能退回到 G_0 期的状态；然而，一旦细胞度过了 G_1 期的生长决定时限进入 G_1 期的最后几个小时（G_1 期最后的10%～20%），再撤除培养血清将不能影响它们的生长进程，它们将完成剩下的 G_1 期并最终通过S、G_2、M期。同样，有丝分裂抑制因子，如TGF-β，也只能在 G_1 的早期和中期发挥作用，一旦细胞进入 G_1 晚期，细胞的生长就如同其周围没有负调节因子一样。

细胞周期进入 G_1 晚期依赖于细胞外信号，然后成为信号非依赖的状态，这种规律表明决定细胞生长的关键时期在 G_1 期末。就是在这个时间段，细胞将决定是否退出细胞周期而进入 G_0 期，还是继续细胞周期进程完成后面的时相。这一关键的转换点被称为**限制点**或**R点**（图8.6）。迄今为止，对大多数哺乳动物细胞的研究发现R点发生在 G_1/S期转化前的几个小时。

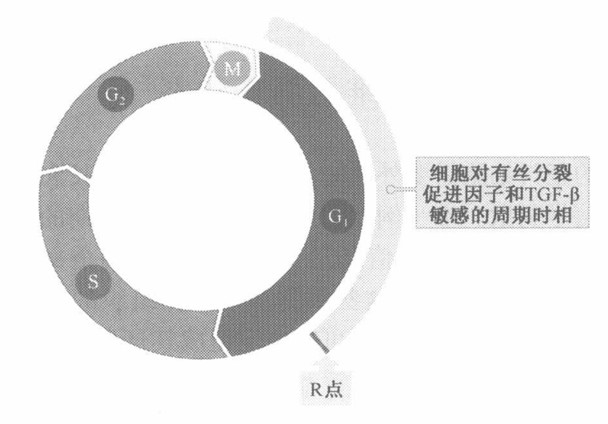


图8.6　细胞周期中对细胞外信号的反应　细胞对促有丝分裂因子和有丝分裂抑制因子（如TGF-β）的反应只局限在 G_1 期开始和结束前的一段时间内。这段时间之后是限制（R）点，即指细胞在此时间点决定是继续细胞周期的进程进入M期，维持在 G_1 期，还是退出活性的细胞周期进入 G_0 期。

如果细胞在R点决定继续完成其生长分裂的周期，它们将自己通过 G_1 期进入S期并且严格完成周期中的一系列事件（整个S、G_2 和M期），保证它们分裂成两个子代细胞。这个决定将持续完成，即使在其后的周期时相中细胞外间隙不存在生长因子。细胞周期随后的步骤（S、G_2、M期）将按照规定的时相进行，在没有其他重要差错时，完

成 S 期，进入 G_2 期并最后进入 M 期。

肿瘤细胞的增殖是失控性生长，因此，对肿瘤细胞的研究热点不是与正常细胞相类似的 G_1-S-G_2-M 的周期进程，而是重点研究 G_0/G_1 期的转化以及对于生长旺盛细胞决定其生长命运的具体时相。

细胞周期的模式（通过 R 点，完成随后的时相，进入 M 期）也并不是绝对的。在 S、G、M 期介入的代谢性、遗传性或者生理性损伤都有可能暂时性中断细胞周期的进程，直到这些损伤解除或修复。然而，在许多情况下，组织中的细胞能够成功避免这些损伤作用。这些都偏离了 R 点作为决定细胞是否生长的关键作用。越来越多的证据表明，在许多类型的肿瘤细胞中都存在解除 R 点决定机制的现象。但是，G_1 晚期的其他决定点仍然对一些肿瘤细胞的异常增殖发挥作用（补充材料 4 ◎）。

8.3 细胞周期素和周期素依赖性蛋白激酶构成细胞周期时钟的核心组件

R 点的存在给我们提出了两个主要的问题：第一，什么是决定细胞在 G_1 期是继续进行还是退回到非增殖状态的分子机制？第二，我们称之为细胞周期时钟的机制是怎样发挥作用的？在本章中，我们将先回答第二个问题，然后返回讨论第一个问题。

如上所述（第 5 章、第 6 章），当细胞信号通过信号调控蛋白向下游应答器传递时，信号的执行功能最终汇集到蛋白激酶上。这些激酶完美地完成了这些作用。通过磷酸化多种不同的靶蛋白（底物），激酶能够产生共价键的改变，使许多激活的底物蛋白发挥分子开关的作用。实际上，细胞周期时钟就是利用一系列蛋白激酶来完成细胞周期进程的不同阶段，如在 G_1/S 期，**中心体**相关蛋白的磷酸化促使中心体在 M 期复制；在 S 期之前某些蛋白的磷酸化激活了染色体 DNA 复制的特定位点；在 S 期和 M 期，组蛋白的磷酸化促进了染色质构型的改变，使这两个时相能正常进行；组成核膜的蛋白（有时被称为核被膜），如核纤层蛋白和核孔蛋白，它们的磷酸化最终导致核膜在 M 早期的崩解。

参与细胞周期调控机制的蛋白激酶被统称为**周期依赖性蛋白激酶**（cyclin-dependent kinase，CDK），这些蛋白激酶不能依靠自身发挥作用，而必须依赖于调节亚单位——**周期素**蛋白的相互结合才能激活从而发挥正常功能。CDK 与其周期素配体构成双分子复合体参与细胞周期时钟的信号向下游成倍放大，而不需要数以百计的周期执行蛋白直接参与细胞生长-分裂周期的调控。

CDK 是丝氨酸/苏氨酸激酶，它们不同于与生长因子受体偶联的酪氨酸激酶以及像 Src 一样的非受体激酶。CDK 具有 40% 的氨基酸序列同源性，因此它们共同构成独立的亚家族，包括人类基因组编码的大约 430 个丝氨酸/苏氨酸激酶。周期素与 CDK 的结合激活了激酶的催化活性（图 8.7）（目前研究比较清楚的例子是周期素 A 与 CDK2，这两个蛋白的结合使 CDK2 的激酶活性增加了 400 000 倍）。与此同时，周期素还具有导向作用，有助于周期素-CDK 复合体在细胞中正确识别蛋白底物。周期素也共同组成了一个细胞蛋白家族，它们具有大约 100 个氨基酸残基组成的共同结构域，参与 CDK 的结合以及激酶的活化。

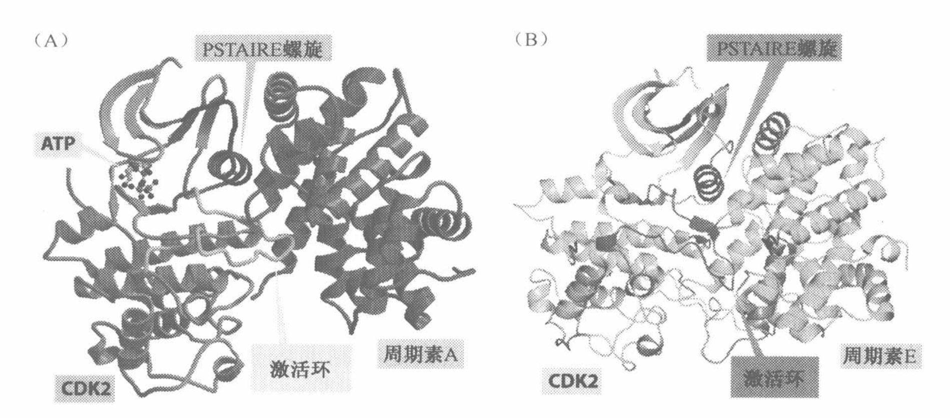


图 8.7 细胞周期素-CDK 复合体 X 射线晶体衍射分析显示细胞周期素-周期依赖性蛋白激酶复合体的空间结构，例如，组成 CDK2 的两种元件：周期素 A 和周期素 E。在此情况下，周期素通过改变 CDK 催化位点的空间构相激活酶活性并介导其对合适底物的磷酸化。(A) 具有 PSTAIRE 保守氨基酸序列的 α 螺旋（红色）存在于所有 CDK，它是结合周期素的特异部位。激活环（黄色）（也被称为 T 环）上的苏氨酸残基被 CDK 活化激酶（CAK）磷酸化用以激活 CDK 的催化功能。周期素 A（紫色）介导 CDK2（海蓝色）对底物的磷酸化推进 S 期进程。(B) 在细胞周期的 G_1 后期，周期素 E 介导 CDK2 对底物蛋白的磷酸化促使细胞进入 S 期。图中品红色显示具有 CDK2 的保守 PSTAIRE α 螺旋和激活环；其他黄色片段参与周期素 E 与中心体的附着，其具体机制未知。(A, from P. D. Jeffrey et al., Nature 376: 313-320, 1995; B, from R. Honda et al., EMBO J. 24: 452-463, 2005.)

周期素-CDK 复合体共同参与了细胞周期时钟的调控机制。大多数 G_1 期，两个功能类似的 CDK（CDK4 和 CDK6）依赖与其相关的三个周期素（D1、D2、D3）并被介导，这三个周期素统称为 D 型周期素（图 8.8）。G_1 晚期的 R 点之后，E 型周期素（E1、E2）与 CDK2 相互结合并促使其对相应底物蛋白的磷酸化以进入 S 期。随着细胞进入 S 期，A 型周期素（A1 和 A2）代替 E 型周期素成为 CDK2 的配体，从而保证 S 期的进程（见图 8.7）S 后期，A 型周期素改变配体，它与 CDK2 解离并重新结合其他 CDK，此复合体被称为 CDC2 或者 CDK1（本文用 CDC2）。随着周期的继续进行，进入 G_2 期后，CDC2 中的 A 型周期素被 B 型周期素（B1 和 B2）所替代。最终，从 M 期开始，B 型周期素参与的 CDC2 复合体触发了前期、中期、后期、末期的许多事件并最终组成有丝分裂的复杂程序。

作为具备良好调控规则的体系，各种周期素-CDK 复合体的激活必须是可以调节的，以强化对细胞周期特定时相的调控。其中最重要的调控手段在于改变细胞周期各个时相中周期素的表达水平和效率。与之不同的是，几乎所有的 CDK 表达水平变化很小。

对周期素与 CDK 调控的最先了解来自于对蛙和海胆早期胚胎中有丝分裂调控因子的研究。研究结果显示，B 型周期素的蛋白水平在有丝分裂之前显著升高，这些周期素 B 与 CDC2 形成复合体促使细胞进入 M 期。M 期末，周期素 B 的周期性降解导致其蛋白水平下降。在下一个细胞周期的早期，细胞中的周期素 B 几乎检测不到，到下一个 M 期之前周期素 B 又开始逐步累积。由于早期胚胎中所有细胞的生长分裂周期是同步

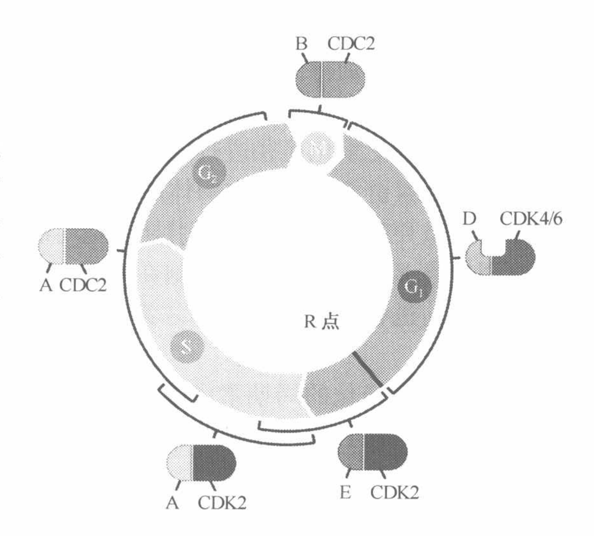


图 8.8 周期素与周期素依赖蛋白激酶的配对 每种周期素都与一个或一系列 CDK 相互结合。D 型周期素（D1、D2、D3）结合 CDK4 或 CDK6；E 型周期素（E1 和 E2）结合 CDK2；A 型周期素（A1 和 A2）结合 CDK2 或 CDC2；B 型周期素（B1 和 B2）结合 CDC2。示意图显示不同周期素-CDK 复合体在不同细胞周期时间点激活。

进行的（同步发生），所有胚胎细胞在相同时间点通过 S 期和 M 期。这一现象导致了周期素蛋白水平的周期性变化。周期素的名称就来源于此（图 8.9）。

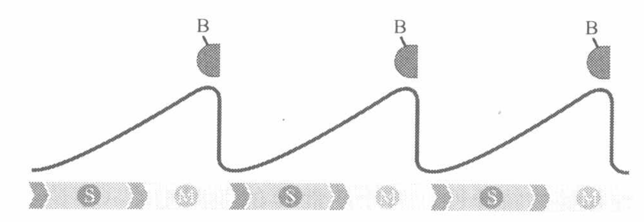


图 8.9 周期素 B 的细胞周期依赖性变化 周期素的名称来源于蛙和海胆早期胚胎细胞中周期素 B 水平随细胞周期的变化而波动。这种波动很显著，因为在早期胚胎中细胞的周期进程是同步化的，如所有细胞同时进入 M 期。在这些早期胚胎中，细胞周期中的 G_1 和 G_2 期（黄色、粉红色袖标）并不存在，而只是 M 期和 S 期的交替变化（尽管周期素 B 的水平在 M 期开始之前累积，周期素 B 的分子不能形成具有催化活性的 B-CDC2 复合体，直至 G_2-M 期的转换）。

周期素 B 蛋白水平随细胞周期显著性变化的现象在其他周期素上也有发生。周期素 E 蛋白水平在细胞通过 R 点后显著升高，而在细胞进入 S 期后下降（图 8.10）；同

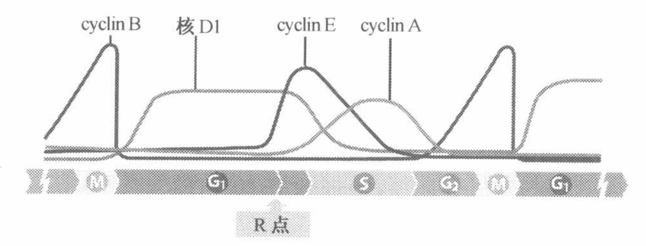


图 8.10 细胞周期中周期素水平的变化 随着细胞周期各个时相的变化，哺乳动物细胞中周期素水平也随之显著性变化。就周期素而言，其蛋白水平的变化与细胞周期的程序严格一致。然而，细胞外信号，特别是生长因子传递的信号，对于 D 型周期素具有显著的影响 [由于周期素 D1（包括其他亚型）存在于包括 G_1 在内的所有细胞周期时相，在 G_1/S 期转化时，它从细胞核转运至细胞质，因而不能对细胞周期进程继续产生影响]。

样，周期素A随着细胞进入S期开始表达升高（虽然周期素A、B、E都有至少两个亚型，而这些亚型分别行使独立的功能，但我们在此仅笼统地称为周期素A、B、E）。

各种周期素随着细胞周期时相的变化而快速地改变是因为它们能够被快速降解，其降解主要是通过泛素化途径进行的，即通过附着多聚泛素链介导其降解。如信息栏7.8所述，多聚泛素链能介导蛋白酶体的蛋白水解作用。周期素的周期性累积和降解在细胞周期中具有重要的意义，因为它引导细胞周期时钟只向一个方向发展，就像一个齿轮一样。以周期素B为例，它保证细胞在完成M期之后不能返回重复进行另一个M期，而只能继续向前进程通过G_1、S、G_2期，直到周期素B累积到必需的水平，细胞才能再次进入M期。

在此程序性变化的周期素中唯一的特例就是D型周期素。周期素D的三个亚型具有相似的结构，它们的蛋白水平在细胞周期各时相中没有明显的变化。相反，D型周期素的水平主要受控于细胞外信号，尤其是多种促有丝分裂生长因子传递的信号。对于在三个亚型中研究最透彻的周期素D1，生长因子激活的酪氨酸激酶型受体以及其下游的多级信号传递导致周期素D1的快速累积（图8.11），同样，从细胞培养基中撤除生长因子将导致周期素D1蛋白水平的快速下降，其半衰期（$T_{1/2}$）约为30min。

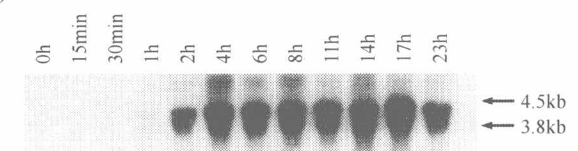
对于D型周期素特异的生物行为的理论解释如下：它们参与细胞外信号向在胞核中起作用的细胞周期时钟的传递过程，由于周期素D的蛋白水平随着胞外丝裂原的水平而波动，继而通过周期素D向细胞周期时钟传递细胞外环境的信号。胞质中合成的周期素D在转运进入细胞核后，与其CDK配体（CDK4或CDK6）相互结合形成复合体。由于这两个CDK功能相似，我们此后就用CDK4/6指代。周期素D-CDK4/6复合体具有相同的酶活性和底物特异性，与周期素D的亚型无关（不论D1、D2、D3）。

为什么哺乳动物细胞要表达三种似乎多余的周期素呢？这些看似多余的周期素为细胞提供了精确的输入途径，增加了反应的灵活性。这三个编码基因的各自启动子被不同的信号通路调控，因此基因的表达受控于不同的细胞表面受体（表8.1）。例如，周期素D1的启动子（在人类中通常指CCND1）具有AP-1、Tcf/Lef和NF-κB转录因子的结合位点（见图8.11B），它们能依次被多种生长因子受体激活；而周期素D2的启动子

表8.1　细胞外信号诱导D型周期素的表达

信号来源	信号通路中间元素	周期素类型
RANK受体	NF-κB通路	D1
泌乳素受体	Jak/STAT	D1
雌激素受体	AP-1TF(?)	D1
黏着斑受体		D1
HER2/Neu受体	E2F和Sp1 TF	D1
Wnts-卷曲受体	β-catenin和Tcf/Lef TF	D1
Bcr/Abl		D2
刺激性囊泡激素受体	环一磷酸腺苷(cAMP)	D2
多种丝裂原	Myc	D2
白细胞介素4、7受体		D2
白细胞介素5受体	STAT3/5	D3
	E2A TF	D3

(A)



(B)

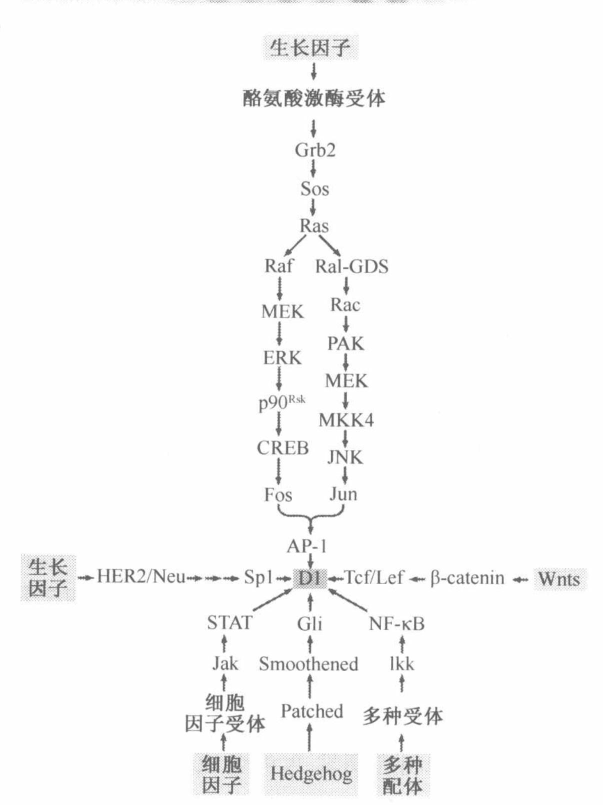


图 8.11 周期素 D1 水平的调控 (A) 研究发现巨噬细胞接触丝裂原 CSF-1 (colony-stimulating factor-1) 能诱导周期素 D1 的显著表达。图示 CSF-1 饥饿的巨噬细胞系在加入新鲜 CSF-1 后，通过 Northern 杂交检测随后各时期内周期素 D1 的 mRNA 水平。(B) 细胞外丝裂原调控周期素 D1 的信号级联反应原理：从生长因子受体 (RTK) 到 AP-1 转录因子（调节细胞核中周期素 D1 转录的因子之一）。如图所示，许多信号通路因子促进了基因的表达。(A, from H. Matsushime et al., Cell 65: 701-713, 1991.)

与 Myc 活化以及胞外信号导致的胞内 cAMP 累积相关；周期素 D3 被发现与转录因子 STAT3 和 STAT5 相关，它们参与白细胞介素受体介导的多种造血细胞活化，而参与激活淋巴细胞分化的转录因子 E2A 也能调控周期素 D3 的表达。

就是利用这种机制，细胞外的多种信号能够通过各种周期素 D 的亚型的水平来调控 CDK4/6 的激酶活性。最近的研究表明，某些周期素在细胞中还能发挥与调节细胞周期进程无关的生物功能（信息栏 8.2）。

信息栏 8.2 D 型周期素具有除调控细胞周期之外的其他功能 20 年来对细胞周期的研究使人们认为细胞周期调控是周期素的唯一功能。实际上，研究表明周期素 D1 还与雌激素受体 (ER) 和转录因子 C/EBPβ 有关。通过与 ER 结合，周期素 D1 模拟该受体的正常配体（雌激素）激活受体的转录活性。大多数 (>70%) 乳腺癌都表达 ER，这一现象解释了雌激素对这些肿瘤细胞产生的促有丝分裂效应。由于周期素 D1 在这些肿瘤细胞中高表达并激活受体，D1-ER 复合体在这些细胞中也能产生促进细胞增殖的重要作用。周期素 D1 与 C/EBPβ 的结合能够抑制其转录活性，这种结合被认为在许多细胞的分化过程中起关键作用。实际上，许多人类乳腺癌细胞的基因表达模式明显表明，周期素 D1 与 C/EBPβ 的相互作用对这些细胞的转录具有显著意义。它们的相互作用也提示周期素 D1 与其他核蛋白的相互作用在今后将被重新发现。

一旦周期素 D-CDK4/6 复合体形成，它们将引导细胞从 G_1 期开始通过 R 检测点。细胞通过 R 点后，剩下的周期素（E、A、B）将完成一系列生物行为，包括从 R 点到 M 期结束的所有程序（图 8.12）。事实上，一旦细胞通过 R 检测点，细胞周期将自主进行而不受细胞外信号的影响。

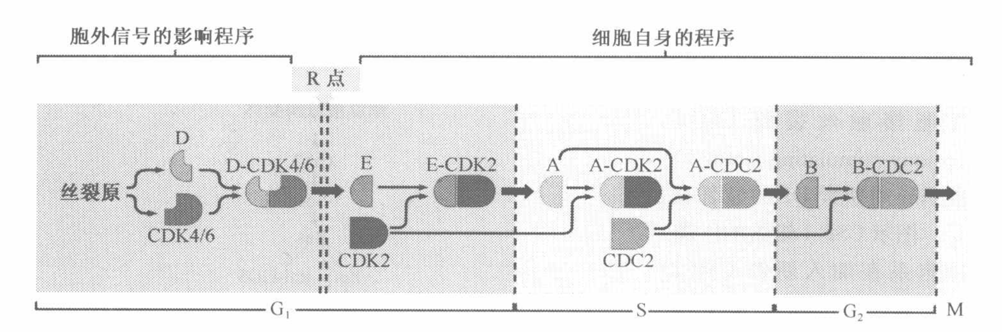


图 8.12　细胞周期中周期素表达水平的调控　尽管细胞外信号在 G_1 期能够强烈影响 D 型周期素的表达水平，细胞中其他周期素的水平与细胞周期的进程严格一致。因此，细胞通过 R 点之后，周期素 E-CDK2 复合体被激活，其他周期素-CDK 复合体的形成也符合一定的程序而不依赖细胞外的生理信号。这种协调的规律部分由于细胞周期某时相中的周期素-CDK复合体能激活下个时相（如图所示）并且抑制上个时相的活化（图中未显示）。

在随后的周期时相中形成的周期素-CDK 复合体能够对上个时相中的周期素-CDK 复合体产生抑制作用，我们对其具体作用机制知之甚少。例如，当周期素 A 在 G_1/S 转换时被周期素 E-CDK 复合体激活后，活化的周期素 A-CDK2 能够使某些转录因子失活，而这些因子在前一时相的 R 点曾诱导周期素 E 的表达。在 S 晚期和 G_2 早期，周期素 A-DC2 复合体开始激活周期素 B-CDC2 从而推进细胞进入有丝分裂，而一旦后者被激活，它又反而抑制周期素 A 的合成。

8.4　周期素-CDK 复合体也能被 CDK 抑制剂调控（CDK 抑制剂调控周期素-CDK 复合体）

如上所述，生理信号对细胞周期时钟的影响仿佛只是通过调控周期素的表达水平，实际上，还存在其他层面的调控方式调节周期素-CDK 复合体的活化，继而调节细胞周期进程。

在这些调控方式中最重要的方式来源于一类蛋白，即 CDK 抑制剂或被称为 CdkIs。迄今为止，7 种 CDK 抑制剂已经被发现能够对抗周期素-CDK 复合体的活化。其中，4 个被称为 INK4（起先被命名为 CDK4 抑制剂），它们能定向结合 CDK4 和 CDK6 复合体，而对 CDC2 和 CDK2 不起作用。这 4 种抑制剂包括 $p16^{INK4A}$、$p15^{INK4B}$、$p18^{INK4C}$ 和 $p19^{INK4D}$。另外 3 个抑制剂是 $p21^{Cip1}$（有时也称为 $p21^{Waf1}$）、$p27^{Kip1}$、$p57^{Kip2}$，它们对细胞周期的晚期存在的周期素-CDK 复合体具有广泛的抑制作用（图 8.13）。

CDK 抑制剂的作用原理可以通过 $p15^{INK4B}$ 和 $p21^{Cip1}$-$p27^{Kip1}$ 耦合对来阐述。当 TGF-β 作用于上皮细胞时，它能引起细胞的一系列下游反应从而抑制细胞增殖，其

中最重要的是 $p15^{INK4B}$水平的升高。$p15^{INK4B}$能够阻断周期素 D-CDK4/6 复合体的形成（图 8.14），并能抑制已经形成的复合体的功能。如果没有活化的周期素 D-CDK4/6，细胞将不能通过 G_1 早期和中期到达 R 点。一旦细胞通过了 R 检测点，细胞将不再依赖周期素 D-CDK4/6 的作用。这或许可以解释为什么 TGF-β 在 G_1 早期和中期具有生长抑制作用，而当细胞通过 R 点后其生长抑制作用将部分甚至全部丧失。

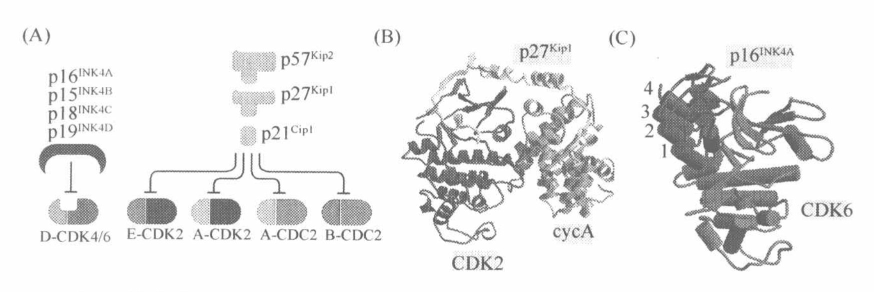


图 8.13 CDK 抑制剂的作用 （A）CDK 抑制剂能够在细胞周期的许多时间点阻断 CDK 的作用。4 个 INK4 蛋白（$p16^{INK4A}$、$p15^{INK4B}$、$p18^{INK4C}$、$p19^{INK4D}$）能够特异性抑制在 G_1 早期和中期活化的 D-CDK4 和 D-CDK6 的作用；与此不同的是，三种 Cip/Kip Cdkis 抑制剂（$p21^{Cip1}$、$p27^{Kip1}$、$p57^{Kip2}$）能够抑制其他在整个细胞周期中起作用的周期素-CDK 复合体（相对而言，对 $p57^{Kip2}$的作用知之甚少）。而 $p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$ 在 G_1 期能够促进 D-CDK4/6 复合物的形成（见图 8.17）。（B）$p27^{Kip1}$ 与周期素 A-CDK2 结合的 X 射线晶体衍射示意图（也见图 8.7），图示 $p27^{Kip1}$ 的一个结构域（亮绿色）通过封闭位于 CDK 缝隙中的催化活性区的 ATP 结合位点，阻断周期素 A-CDK2 的功能。（C）INK4 的成员，如图示的 $p16^{INK4A}$（红褐色）与 CDK6（红色）和 CDK4（图中没有显示）相互作用。这些 CDK 抑制剂改变 CDK6 上周期素结合位点的空间构象，降低与 D 型周期素的亲和性。与此同时，它们改变 ATP 的结合位点继而降低催化活性。CDK4 对 $p16^{INK4A}$也具有相同的反应 。（B，from A. A. Russo et al.，Nature 382：325-331，1996；C，from A. A. Russo et al.，Nature 395：237-243，1998.）

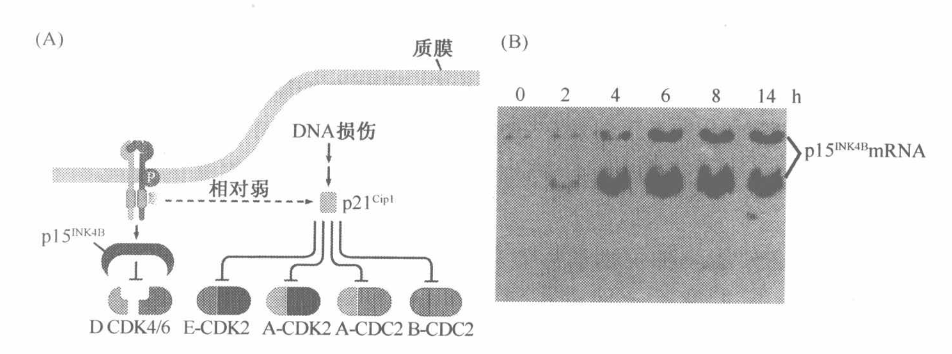


图 8.14 TGF-β 对细胞周期的调控 （A）TGF-β（左上）通过调控 CDK 抑制剂的水平对细胞周期产生影响。它能强烈诱导 $p15^{INK4B}$的表达，并且对 $p21^{Cip1}$ 也有一定的诱导作用，其中，前者能够阻断周期素 D-CDK4/6 的反应，后者能够影响周期中其他周期素-CDK 复合体的活化。通过此作用，细胞 DNA 的损伤能导致 $p21^{Cip1}$ 水平的快速上升，进而下调在通过 R 点后活化的周期素-CDK 复合体。（B）当 TGF-β 作用于人角化细胞时，Northern 杂交显示 $p15^{INK4B}$的 mRNA 合成提高 30 倍。图上部标示 TGF-β 对这些细胞的作用时间（h）。（B，from G. J. Hannon and D. Beach，Nature 371：257-261，1994.）

$P21^{Cip1}$，一种广泛的 CDK 抑制剂，也能够被 TGF-β 诱导，尽管作用较弱。各种生理的应激反应可能导致 $p21^{Cip1}$ 水平的升高（见图 8.14A），这具有很重要的意义，一旦达到一定的表达水平，$p21^{Cip1}$ 能够在细胞周期的许多时段阻断其进程。所有应激中最严重的是对细胞基因组的损伤。在基因组 DNA 持续非修复状态的情况下，诱导的 $p21^{Cip1}$ 将降低已经形成周期素-CDK 复合物的活性，如 E-CDK2、A-CDK2、A-CDC2、B-CDC2；一旦 DNA 的损伤被修复，$p21^{Cip1}$ 的阻断作用解除。这一策略在 G_1 期具有特殊的意义：如果这一时期细胞的基因组被诱变剂损伤，$p21^{Cip1}$ 将阻止细胞通过 R 点（通过抑制 E-CDK2 复合体），直至 DNA 损伤被修复，以保证细胞不能进入 S 期，使得受损的 DNA 序列不被复制。而且，$p21^{Cip1}$ 能抑制一种被称为 PCNA（proliferating cell nuclear antigen）的 DNA 复制关键组件的功能；这一功能能够保证已经开始的 DNA 复制中止直到 DNA 完成损伤修复。我们将在下一章讨论调控 $p21^{Cip1}$ 表达的机制（9.9 节）。

当 DNA 损伤（甚至极微小的损伤）时，TGF-β 能够提高 $p21^{Cip1}$ 的表达水平（继而阻断细胞周期进程），促细胞分裂剂能够起到 CDK 抑制剂相反的作用，通过这种方式推进细胞周期进程。它们的作用机制依靠磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）通路，PI3K 能直接或间接被促细胞分裂剂激活进而激发许多酪氨酸激酶受体（图 8.15A）。

Akt/PKB 是一种重要的激酶，它被促细胞分裂剂活化的 PI3K 激活（6.6 节）。Akt/PKB 能磷酸化定位于胞核的 $p21^{Cip1}$，促进其从胞核转运至胞质，而位于胞质中的 $p21^{Cip1}$ 将不能对周期素-CDK 复合体产生抑制作用（图 8.15B）。同样，Akt/PKB 能够磷酸化 $p27^{Kip1}$（其功能与 $p21^{Cip1}$ 类似）并抑制 $p27^{Kip1}$ 从其合成的胞质部位转运到细胞核，而 $p27^{Kip1}$ 通常在胞核发挥其关键作用（图 8.15C）。综上所述，这些信号反应显示了细胞外生长抑制信号（TGF-β 传输的）如何阻碍细胞周期的运行，同时生长促进信号是如何推进周期进程的。

这些细胞内信号的作用也具有一定的临床意义，例如，在低度恶性（早期）的人乳腺癌中，Akt/PKB 的活化水平很低，因此 $p27^{Kip1}$ 能够在细胞核中发挥其抑制增殖的功能。然而在高度恶性的肿瘤中，累积了大量活性的 Akt/PKB，因而绝大部分的 $p27^{Kip1}$ 在细胞质中被发现（图 8.16A），这种细胞内的定位与这些肿瘤的致死率相关（图 8.16B）。

在 $p21^{Cip1}$ 与 $p27^{Kip1}$ 的一种生物学行为看似很矛盾，当它们抑制 E-CDK2、A-CDC2、B/CDC2 的作用时，它们实际上促进了周期素 D-CDK4/6 复合体的形成（图 8.17A），而且一旦 D-CDK4/6 与其中任何一个 CDK 抑制剂形成三元复合体，周期素 D-CDK 仍然能够磷酸化它的正常底物。因此，所谓的“CDK 抑制剂”实际上是一个误称。这两个蛋白（$p21^{Cip1}$ 与 $p27^{Kip1}$）对大多数周期素-CDK 复合体具有抑制作用，但是它们对周期素 D-CDK4/6 却具有刺激作用。

尽管 $p27^{Kip1}$ 在很多方面与 $p21^{Cip1}$ 具有相似的功能，它还具有其特异的有趣的生物行为。当细胞在 G_0 期时，$p27^{Kip1}$ 累积并结合 E-CDK2，这种结合能抑制复合体的活性。当细胞受到生长因子的作用时，D-CDK4/6 开始累积，因为促细胞分裂剂能够提高细胞中 D 型周期素的水平。每当新的 D-CDK4/6 复合体形成时，它能捕获并结合其他

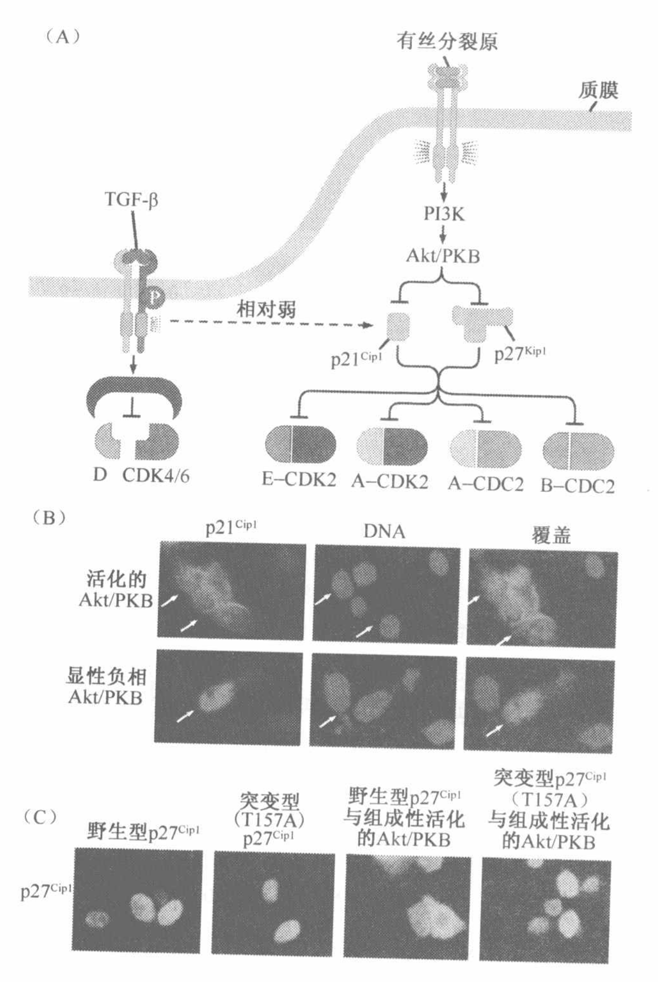


图 8.15 调控细胞周期进程 细胞外信号通过控制细胞内 CDK 抑制剂的水平和定位对细胞周期进程产生影响。(A) 在 G_1 期，TGF-β 诱导 $p15^{INK4A}$ 和 $p21^{Cip1}$ (较弱) 的表达，对 D-CDK4/6 和 E-CDK2 复合物产生负调节 (见图 8.14)。相反，促细胞分裂剂通过 $p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$ 的磷酸化以及胞浆定位的改变，阻断这些 CDK 抑制剂进入胞核，进而抑制多种周期素-CDK 复合体的活性。(B) 活性的 Akt/PKB (上) 异位表达能够导致定位于细胞核 (蓝色，中) 的 $p21^{Cip1}$ 在细胞质中大量聚集 (红色，左)；可见两图像重叠 (右)。相反，显性负相 Akt/PKB 的表达 (干扰 Akt/PKB 的功能) (下) 促进 $p21^{Cip1}$ 的细胞核定位，从而抑制细胞周期进程。(C) 在正常细胞中 (左 1)，野生型 $p27^{Kip1}$ (绿色) 特异性定位于细胞核，当 $p27^{Kip1}$ 上被 Akt/PKB 磷酸化的苏氨酸残基突变 (左 2) 时，$p27^{Kip1}$ 的细胞定位不会改变 (T157A 突变，使丙氨酸取代了第 157 位苏氨酸)。如果伴随着 Akt/PKB 的持续表达，野生型 $p27^{Kip1}$ 在细胞质中大量聚集 (左 3)；而如果表达不能被 Akt/PKB 磷酸化的 $p27^{Kip1}$ 突变体，它能对抗 Akt/PKB 的作用，持续定位于细胞核内 (左 4)。(B, from B Zhou et al., Nat. Cell Biol 3: 245-252, 2001; C, from G. Viglietto et al., Nat. Med. 8: 1136-1144, 2002.)

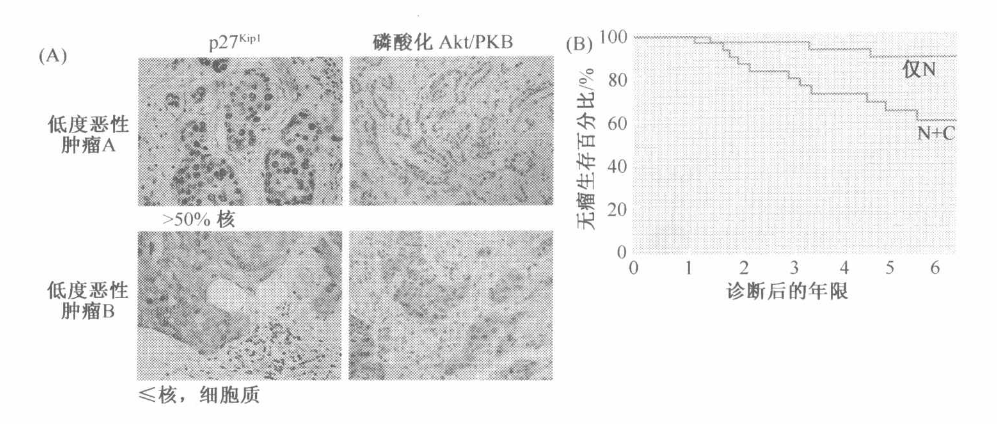


图 8.16 人乳腺癌中 Akt/PKB 对 $p27^{Kip1}$ 功能的抑制作用 多种乳腺癌显示：$p27^{Kip1}$ 不同的亚细胞定位能够反应 Akt/PKB 的不同激活状态；后者能够通过特异性磷酸化（这种酶的功能活化状态）抗体来检测。(A) 在某些低度恶性的原发性乳腺癌中（如肿瘤 A），$p27^{Kip1}$ 特异性定位于细胞核，它能够在大于 50%的细胞核中检测到（褐色区域，左上，>50%）；而在这些细胞中活性的磷酸化 Akt/PKB 不能检测到（右上）。相反，在某些其他肿瘤中（如肿瘤 B，左下），$p27^{Kip1}$（黄色区域）被发现其核定位低于 50%，主要定位于细胞质，而定位于细胞质的 $p27^{Kip1}$ 不能抑制细胞的增殖；在这些肿瘤中，活性的磷酸化 Akt/PKB 很容易被检测到（浅棕色区域，右下）。(B) Kaplan-Meier 曲线显示：$p27^{Kip1}$ 主要定位于核的原发肿瘤患者（绿色曲线）其初步诊断和治疗的预后良好，无瘤生存率超过 6 年；而 $p27^{Kip1}$ 在胞核和胞质中都有定位的肿瘤患者（蓝色曲线），其复发率高，很多患者最终死亡。（重要的是，这一临床的关联结果不能证明 $p27^{Kip1}$ 异位与肿瘤进程的因果关系。）(A, courtesy of J. Zubovitz and J. M. Slingerland; B, from J. Liang et al., Nat. Med. 8: 1153-1160, 2002.)

$p27^{Kip1}$ 分子，结果导致细胞中游离的 $p27^{Kip1}$ 减少。几个小时后，剩下的 $p27^{Kip1}$ 分子都从 E-CDK2 复合体上解离（图 8.17B）。一旦 E-CDK2 复合体蛋白解除了 $p27^{Kip1}$ 的作用，这种复合体就能推进细胞通过 R 检测点。

证据表明，机体中许多有丝分裂期后的分化细胞被多种 CDK 抑制剂结合。例如，在小鼠小脑发育过程中，处于有丝分裂期后的细胞层 $p27^{Kip1}$ 表达水平较高，而仍然处于活性细胞周期中的细胞缺乏这些 CDK 抑制剂（图 8.18A）。一旦这些组织在小鼠出生后形成，这部分脑组织中的细胞由于 $p27^{Kip1}$ 而维持在有丝分裂期后的状态，并且在整个生长过程中 $p27^{Kip1}$ 持续高表达（图 8.18B）。

除了这些 CDK 抑制剂，通过 CDK 自身共价键的改变也是调控周期素-CDK 复合体（信息栏 8.3）的一种途径；解除 CDK 抑制剂的作用能够促进肿瘤的发展（详见下文），而其他的调控途径在肿瘤发展的特定时期也能发挥关键作用。

信息栏 8.3 CDK 分子的磷酸化也能调控其活性 还存在另一个调控细胞周期时钟的途径，即 CDK 分子自身共价键的改变。CDK 必须在特定氨基酸残基上磷酸化以激活其功能（见图 8.7），与此同时，其他氨基酸残基上的抑制性磷酸化基团必须被去除。刺激性磷酸化反应来自被称为 CAK（CDK-激活激酶）的丝氨酸/苏氨酸激酶，抑制性磷酸化基团的去除来自被称为 CDC25A、CDC25B、CDC25C 的磷酸酯酶。由于在肿瘤细胞中没有关于这种途径的足够证据，因此本文没有做进一步阐述。

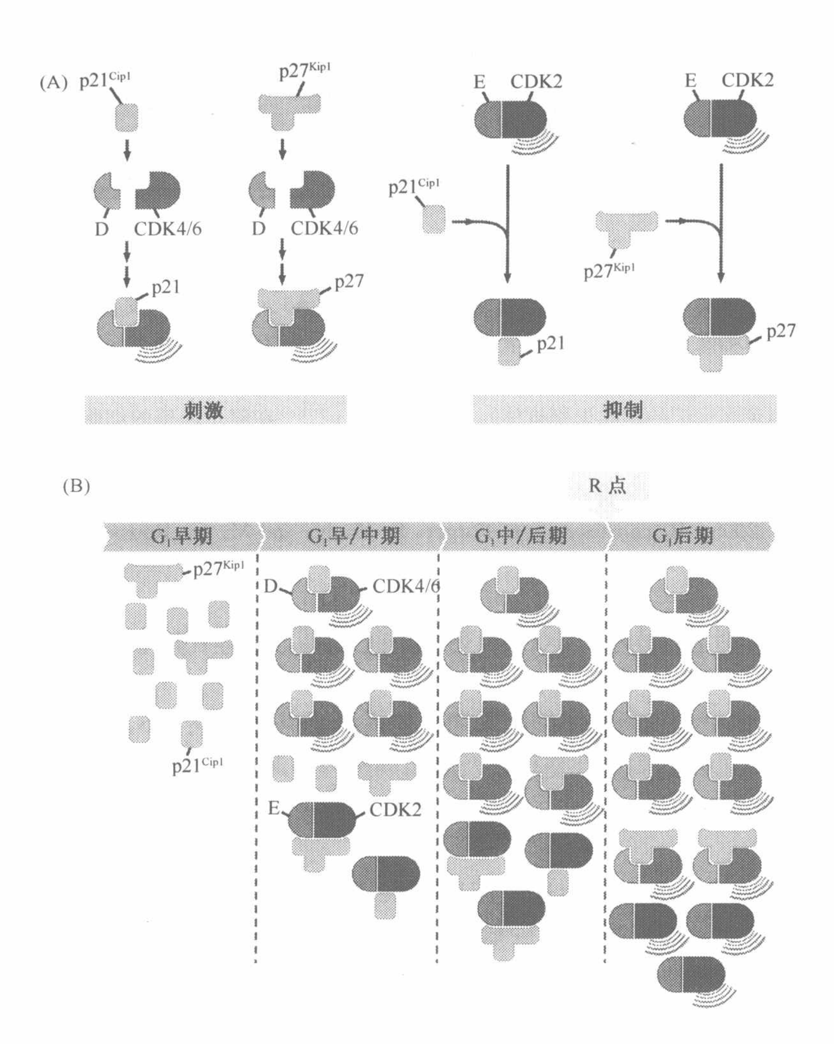


图 8.17 CDK 抑制剂与周期素-CDK 复合体的相互作用 （A）CDK 抑制剂能够在许多方面影响周期素-CDK。CDK 抑制剂的 $p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$ 家族能够在 G_1 晚期、S、G_2、M 期抑制周期素-CDK 的活性（本图只显示了 E-CDK2，右），同时还能促进 D-CDK4/6 复合体的形成（此复合体在 G_1 早期和中期激活）并激活其催化活性（左）。（B）处于 G_1 早期的细胞通常具有两种高浓度的 CDK 抑制剂：$p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$（绿色，左）。随着 D-CDK4/6（红色/粉红色）在 G_1 早期和中期的累积（被胞外促细胞分裂剂诱导），它们与 $p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$ 结合并使它们的比率增加，包括游离的成分（未与任何周期素-CDK 结合）以及与 E-CDK2 结合成分（右，暗紫色）。与 D-CDK4/6 结合的这两类 CDK 抑制剂不能对复合体的催化活性产生负调节作用。（见图 8.17A）。然而，随着这一程序持续进行，D-CDK4/6 从 E-CDK2 上（G_1 晚期）捕获了大量 $p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$（右）。最终，解离的 E-CDK2（右下）促进了 R 点转化以及磷酸化反应的发生，从而推进细胞进入 G_1 晚期和 S 期。

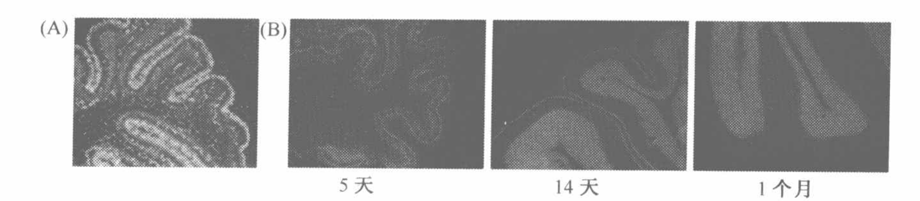


图 8.18　小脑细胞中有丝分裂期后的 $p27^{Kip1}$ 的作用　大多数哺乳动物中小脑的发育发生在动物出生之后，伴随着细胞的分化和进入有丝分裂期后的状态。(A) 小鼠小脑的发育过程中，向细胞中掺和一种脱氧胸腺嘧啶类似物——溴脱氧尿苷 (BrdU)，利用特异识别 BrdU-DNA 的抗体免疫荧光染色可以检测发育细胞。图示出生 7 天后的发育细胞（绿色）中同一层面出现的 $p27^{Kip1}$ 表达水平（红色，利用荧光标记的特异识别抗体）。如图所示，$p27^{Kip1}$ 在停止增殖的细胞中累积。(B) 随着出生后小鼠小脑的发育成熟，$p27^{Kip1}$（红色）的表达水平在不分裂的小脑颗粒细胞中进行性增加，并且在整个成熟期维持较高水平。(A, from T. Uziel, F. Zindy, S. Xie et al., Genes Dev. 19: 2656-2667, 2005; B, courtesy of A. Forget, F. Zindy, and M. F. Roussel.)

8.5　病毒癌蛋白揭示 pRb 阻断细胞周期进程的机理

我们已经从多个角度研究了细胞周期，包括清晰描述了 G_1、S、G_2、M 4 个独立的亚期，周期素和 CDK 的周期性变化以及对周期进程的调控，胞外信号通过周期素-CDK 推动细胞的周期进程和通过 R 点的原理。然而，这些并没有从分子水平精确阐明 R 点转换的机理。

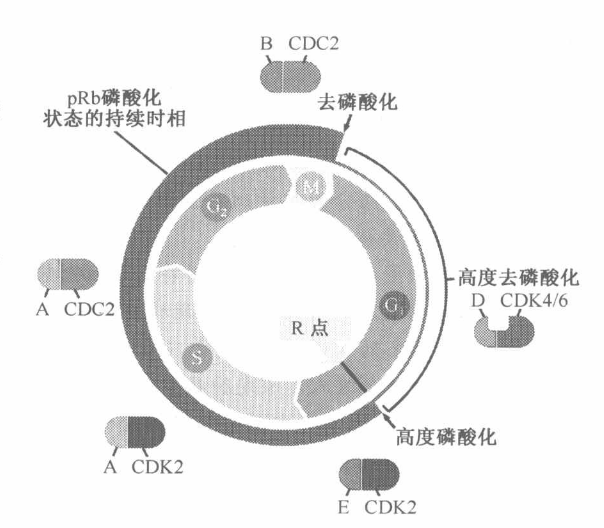
Rb 肿瘤抑制基因的发现为这一问题提供了解释。Rb 的缺陷参与了视网膜母细胞瘤、肉瘤小细胞肺癌以及其他肿瘤的发生发展（7.3 节～7.5 节）。随着 1986 年 *Rb* 基因的发现，同时发现该基因编码一个约 105kDa 的核磷酸化蛋白。这个蛋白被称为 pRb 或 RB，在上述多种肿瘤细胞中都发现该蛋白的缺失或结构缺陷。

早先的实验结果显示 pRb 的磷酸化与细胞周期的进程相一致。在 G_0 期，pRb 基本是非磷酸化状态；在进入 G_1 期后，少量的丝氨酸/苏氨酸残基开始磷酸化（**低磷酸化**）；在细胞通过 R 点后，大量的丝氨酸/苏氨酸残基被磷酸化（**高度磷酸化**）（图 8.19）。一旦细胞通过 R 点，pRb 在随后的整个细胞周期中持续维持高磷酸化状态；在细胞完成有丝分裂后，pRb 上的磷酸化基团被 I 型蛋白磷酸酯酶（PP1）水解去除。这些磷酸基团的水解是下一个细胞周期的必需阶段，由此，pRb 开始进入下一个磷酸化循环。

实际上，pRb 的高度磷酸化与细胞通过 R 点的时间相一致提示这个蛋白可能是 R 点转换的分子调节器。另一个关键的证据来源于 1988 年发现的 DNA 肿瘤病毒编码的肿瘤蛋白与 pRb 之间的物理性相互作用。DNA 肿瘤病毒能够通过其编码的肿瘤蛋白使细胞发生转化。与 RNA 肿瘤病毒（如 RSV）编码的肿瘤蛋白不同，在正常未感染细胞中很少发现 DNA 肿瘤病毒编码蛋白类似的蛋白（3.4 节和 3.6 节）。

1988 年的研究揭示了一个关于 DNA 肿瘤病毒编码蛋白干扰细胞生长的重要调控机

图 8.19 pRb 的细胞周期依赖性磷酸化 pRb 的磷酸化状态（红色环）与细胞周期进程高度一致。随着细胞通过 M/G_1 转换，pRb 上绝大多数磷酸化基团被水解去除，pRb 保持非磷酸化状态；当细胞通过 G_1 期，pRb 被加上少量的磷酸化基团（作用来自 D-CDK4/6 复合体），产生低磷酸化 pRb；然而，当细胞通过 R 点后，E-CDK2 大量磷酸化 pRb，使 pRb 保持高度磷酸化状态；在剩下的整个细胞周期中，pRb 的磷酸化持续增加直到细胞进入 M 期。



制：人类 5 型腺病毒中 E1A 癌基因编码蛋白的生化特征表明，在腺病毒感染的细胞中，这种肿瘤蛋白能够紧密结合许多细胞蛋白，其中包括 pRb（图 8.20；信息栏 8.4）。随后，在人宫颈癌中也发现病毒 SV40 编码的大 T 肿瘤蛋白和人类 HPV 病毒编码的 E7 肿瘤蛋白也能与 pRb 形成物理性复合物。

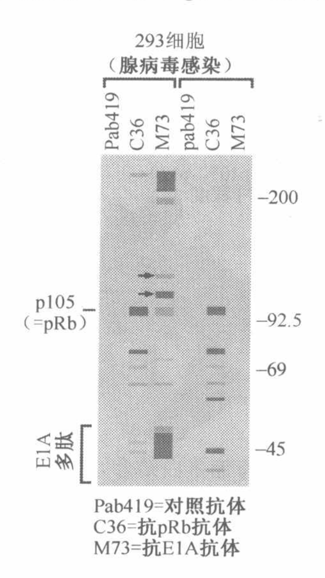
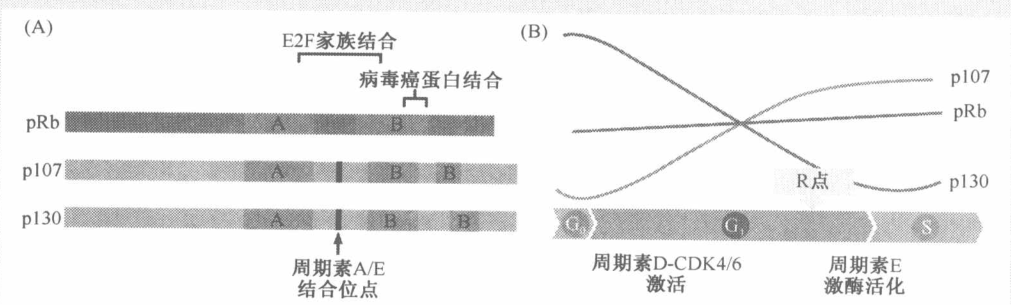


图 8.20 细胞蛋白与腺病毒 E1A 编码蛋白的免疫共沉淀 腺病毒 E1A 编码蛋白来自腺病毒感染 293 细胞，用 M73 抗 E1A 单克隆抗体，免疫共沉淀结果显示一系列细胞蛋白能够与 E1A 发生共沉淀，包括 pRb（此处称为 p105）（第三泳道）；共沉淀的其他宿主蛋白被鉴定，其中包括 pRb 的两种同源蛋白：p107 和 p130（第三泳道，箭头所示）。对于未感染腺病毒的 HeLa 细胞，M73 抗 E1A 单克隆抗体不能沉淀 E1A 和细胞的蛋白（右边三条泳道）。对照抗体（Pab419）不能沉淀两种细胞中的任何蛋白；抗 pRb 抗体（C36）能够从两种细胞中沉淀 p105（pRb）。不同的红色阴影分别表示抗体的重链和轻链。（Adapted from P. Whyte et al.，Nature 334：124-129，1988.）

三种不同的 DNA 肿瘤病毒编码蛋白（E1A、大 T 抗原、E7）在结构上互相并无关联，但是它们都能结合一个共同的细胞蛋白——pRb。这也提示至少在三种情况下病毒编码的肿瘤蛋白能够干扰细胞 pRb。既然选择进化的结果使得病毒的增殖更有效率，这一发现也提示 pRb 被这三种肿瘤病毒编码蛋白隔绝或功能失活对于病毒在感染细胞中的复制是必需的。

信息栏 8.4　病毒 E1A 和大 T 癌蛋白募集许多细胞靶蛋白　如图 8.20 所示，抗 E1A 单克隆抗体能够不仅能够沉淀 E1A 自身，而且在腺病毒感染细胞中还存在大量细胞蛋白与 E1A 有物理相互作用。这些蛋白中首先被鉴定的是 pRb，随后，两个 pRb 相关蛋白——p107 和 p130 也被鉴定；pRb 与这两个同源蛋白通常被称为**“袋蛋白”**（pocket protein）（图 8.21A），具体原因见下文讨论。之后，一个高分子质量细胞蛋白，p300，也被鉴定是 E1A 的靶蛋白。细胞中还存在许多 E1A 结合蛋白需要被鉴定。

在这三种袋蛋白中，p130 似乎对特定的细胞类型具有很重要的维持其静止状态的作用，因此，p130 可能参与细胞周期中 G_0 到 G_1 期转换的调控（图 8.21B）。然而，p107 的表达在细胞通过 R 点后被诱导。pRb 的这两个同源蛋白（p107 和 p130）在肿瘤发生发展过程中发挥次要作用，因为这两个蛋白的突变体在人类原发肿瘤中很少发现（与 *Rb* 基因在肿瘤中的高突变率相对比）。后续的工作显示：E1A 与多种宿主蛋白的结合可以导致它们功能的改变，包括它们的失活。因此，E1A 与多种细胞蛋白的结合表明腺病毒通过单一的病毒编码蛋白就能干扰或异常调节多种细胞周期调控途径。病毒编码的肿瘤蛋白如腺病毒 E1A 蛋白或 HPV E7 能够通过袋蛋白上都存在的具有进化保守序列的小沟与这三种袋蛋白结合（图 8.21C）。



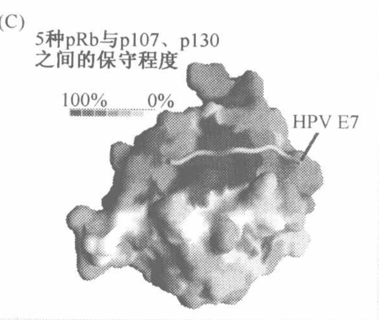


图 8.21　袋蛋白　（A）pRb 是三种被称为“袋蛋白”的结构类似蛋白的一员。这三种蛋白都能结合病毒编码蛋白，如腺病毒 E1A 蛋白（图 8.20）、SV40 大 T 蛋白，以及人 HPV E7 蛋白。所有这三种袋蛋白都能被周期素 D-CDK4/6 复合体磷酸化，不同的袋蛋白能结合 E2F 转录因子的不同亚型（下文讨论）。（B）不同的袋蛋白存在于细胞周期的不同时相，p130 参与加强细胞的静止状态，pRb 参与通过 G_1 晚期和 S 期的调控，p107 参与 G_1 晚期和 S 期之后的周期进程的调控。（C）与病毒编码肿瘤蛋白锚定的袋蛋白小沟（氨基酸序列 LxCxE 能被所有癌蛋白结合，“x”代表可变的氨基酸）是 5 种哺乳动物物种中袋蛋白（pRb 蛋白、p107 蛋白、p130 蛋白）的高度保守序列，这种结合方式解释了病毒编码蛋白结合所有三种袋蛋白的可能性。这个小沟是一种特异的空间模序。序列的保守度通过不同的绿色阴影表示，深绿色表示为最保守的序列，黄色表示 pRb 上 HPV E7 结合区域的多肽主链。（B，from M. Classon and N. Dyson，Exp. Cell Res. 264：135-147，2001；C，from J. O. Lee et al.，Nature 391：859-865，1998.）

病毒-宿主蛋白复合物的发现加深了我们对 DNA 肿瘤病毒导致感染细胞转化的理解，我们从中得到的启示是：在正常细胞中，Rb 发挥肿瘤抑制基因的功能，因此，*Rb* 基因通过其编码蛋白 pRb 在某些情况下抑制细胞的增殖。DNA 肿瘤病毒通过编码肿瘤蛋白募集结合 pRb 干扰其活性，并最终导致 pRb 的功能失活。这种结合能够阻断 pRb

对细胞周期的调控作用，使细胞的表现与染色体两个 *Rb* 等位基因突变导致的细胞表型相同。而且，这一发现也提示 DNA 肿瘤病毒能够通过干扰细胞中起关键作用的生长抑制蛋白使细胞发生转化，从而使感染细胞逃逸 pRb 产生的正常生长抑制作用（实际上，HPV E7 蛋白不仅能阻断 pRb，还能介导 pRb 的泛素化从而促进其降解；见信息栏 7.8）。

实验还发现，DNA 肿瘤病毒编码蛋白能够优先结合低磷酸化的 pRb，而这种低磷酸化的 pRb 主要出现在 G_1 期（见图 8.19）。相反，G_1 晚期以及随后的细胞周期中出现的高度磷酸化 pRb 被这些病毒编码癌蛋白所忽略。这一发现也提示：肿瘤病毒编码蛋白主要作用于特定状态下的 pRb——存在于 G_1 早期和中期的起生长抑制作用的 pRb，而对于那些已经通过其他途径失活的 pRb 病毒编码蛋白不起作用。

上述证据表明在 G_1 早期和中期的 pRb 是低磷酸化状态，它对细胞的生长起抑制作用；而在 R 点之后发现的 pRb 是高度磷酸化状态，它丧失了生长抑制功能，即蛋白质的磷酸化使其功能失活。这意味着 R 点转换（通过生理标准界定，生长因子非依赖性）通过 pRb 的生化改变来完成，即从一个生长抑制蛋白转化成功能惰性状态。这一观点很快被许多其他类型的实验证实。

进一步的研究表明 pRb 的磷酸化是可逆的过程（相对于图 8.19 显示），因此，如果细胞在 S 或 G_2 期受到物理性应激，磷酸化的 pRb 可以被目前尚未知的磷酸酯酶水解，从而使 pRb 回到抑制生长的状态。这些应激包括缺氧、DNA 损伤、有丝分裂纺锤体破坏等。上述 pRb 调控生长抑制的反应推测只是暂时的，一旦细胞生理的应激或损伤解除，这种反应也将逆转。

8.6 pRb 在细胞周期中监控限制点

许多证据表明，在 G_1 早期和中期起生长抑制作用的 pRb 当细胞通过 R 检测点后被高度磷酸化而失去活性，继而成为部分或完全无活性的生长抑制因子。实际上，pRb 就像这扇大门的监护一样使这条通道保持关闭状态，直到 pRb 被高度磷酸化而失去生长抑制功能，这扇大门才打开，允许细胞进入 G_1 晚期以及剩下的细胞周期时相。

既然 pRb 是监控细胞生长与否的关键，它的磷酸化必须被严格调控，不难设想细胞周期的某些组件理所当然的调控着 pRb 的磷酸化。在 G_1 早期和中期，D 型周期素与其配体 CDK4/6 参与 pRb 的起始磷酸化，并导致其高度磷酸化状态。既然周期素 D 的表达水平在很大程度上受到细胞外信号尤其是促有丝分裂生长因子的调控，我们能归纳出这样一条信号通路：生长因子诱导周期素 D 的表达；周期素 D 与 CDK4/6 相互结合；pRb 起始磷酸化（图 8.22）。

在正常的细胞周期中，pRb 的起始磷酸化对于其在 R 点的功能失活是必需的，但是条件并不充分，因为需要 pRb 的高度磷酸化。实际上，周期素 E 的表达水平在 R 点显著升高，周期素 E 与其配体 CDK2 相互作用能促进 pRb 磷酸化的完成，使 pRb 进入高度磷酸化状态而功能失活（见图 8.22）。这意味着 pRb 不经过 D-CDK4/6 的起始磷酸

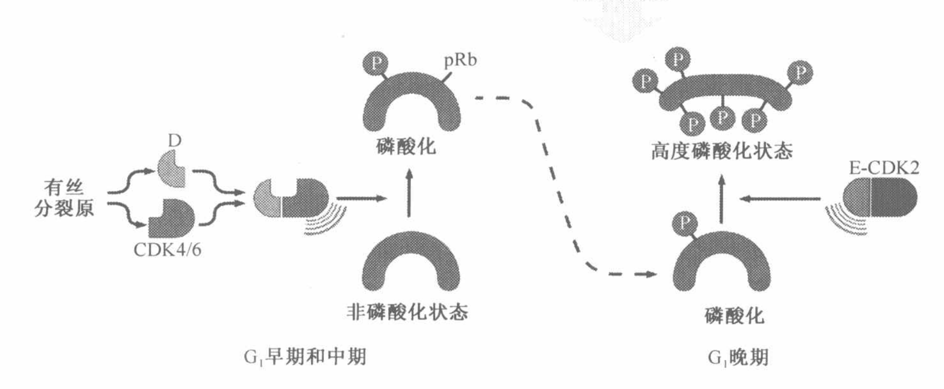


图 8.22 促有丝分裂剂对限制点转化的调控 D型周期素的表达水平很大程度上被细胞外信号调控。因为周期素D与其配体CDK4和CDK6相互作用能够促进pRb的磷酸化——R点转化的必要条件。此反应保证R点转化对细胞外信号的反应（也见图8.15）。E-CDK2对pRb的磷酸化（使pRb处于高度磷酸化状态并导致其功能的完全失活），进一步推进了反应的进程。

化，它将不能成为E-CDK2复合体的磷酸化底物。pRb的同源蛋白，p107和p130，它们的磷酸化和功能失活也在D-CDK4/6的调控之下，其中或许还包括E-CDK2复合体的作用。

如果在G_1早期到R点的时间段内撤除促细胞分裂剂，D型周期素（周期素D1）的表达水平将大幅度下降。没有周期素D1的作用，pRb通过一个未知的磷酸酯酶使其磷酸化基团丢失，结果可能导致蛋白不能成为E-CDK2的磷酸化底物。这一反应强调了在G_1早期到R点的时间段内持续较强促细胞分裂信号作用的必需性。

一旦细胞通过R点，pRb的高度磷酸化以及功能失活状态的维持和加强主要通过周期素E、A、B及其各自相关联的CDK的作用，这些周期素-CDK复合体都不参与细胞外信号反应——我们设想细胞周期时钟机制精确调控R点转换之后的周期程序的执行以及S、G_2、M期各时相的转换。

这一程序也揭示了pRb作为调控细胞增殖关键角色的原因，如果pRb在细胞中缺失（通过染色体上*Rb*基因突变，*Rb*基因启动子甲基化，或者DNA肿瘤病毒编码蛋白的作用），该蛋白将不再能监控R限制点。在一些肿瘤细胞中，我们可以看到pRb的磷酸化失控导致不适当的磷酸化以及pRb的功能失活。证据显示在其他一些肿瘤细胞中，pRb的去磷酸化（伴随功能活化）从未发生，而这种去磷酸化正常发生在M/G_1转换期，通过PPI磷酸酯酶的作用完成。这一现象导致pRb持续磷酸化状态，从而在这些细胞的整个生长分裂周期内始终处于功能失活状态。没有pRb的监控作用，细胞通过G_1进入S期将不受控制，而正常情况下这种控制保证细胞周期在前一个时相全部完成后才能继续进行。事实上，正像我们所看到的pRb的磷酸化失控是如此的普遍，以至于人们开始认为这条重要的信号通路在所有人类肿瘤中都是混乱的。

pRb的活化似乎与其同源蛋白（p107和p130）的活化相互重叠，这使人们提出一

个疑问：为什么 pRb 是这三种蛋白中唯一对肿瘤发生发展起明显作用的蛋白？目前还没有确切的答案，或许是因为细胞周期中这两种同源蛋白特定的活化时间（见信息栏 8.4 和图 8.21B)。p130 在细胞处于 G_0 期时起特异的抑制细胞增殖的作用；p107 主要在 G_1 晚期和 S 期活化；只有 pRb 的活化正好调控 R 点从促有丝分裂剂依赖到非依赖性生长的转化。

8.7 E2F 转录因子保证 pRb 完成生长/休眠的调控

如上所述，许多证据表明，pRb 的低磷酸化抑制 G_1 进程，而高度磷酸化使其失去这种抑制作用。然而，没有证据显示 pRb 如何执行这种控制作用。20 世纪 90 年代早期的研究表明 pRb 主要通过一些转录因子（被称为 E2F）完成调控功能。

当 pRb（及其同源蛋白，p107 和 p130）处于非磷酸化或低磷酸化状态时，它们能结合 E2F，包括与 DNA 结合的 E2F；然而，当被高度磷酸化后，pRb 和它的同源蛋白（统称为袋蛋白，见图 8.21）从 E2F 上解离（图 8.23A)。这提示了一个关于 pRb 调控细胞周期进程的简单模式：在 G_1 早期和中期，E2F 与许多基因的启动子调控相关；与此同时，这些转录因子与袋蛋白结合；袋蛋白参与抑制 E2F 的转录起始作用；相应的，在细胞周期的 G_1 期依靠 E2F 转录的基因被抑制。然而，当袋蛋白在 G_1 晚期的 R 点被高度磷酸化后，它们与 E2F 解离，允许 E2F 起始相关基因的转录，这些基因的蛋白产物依次引导细胞从 G_1 晚期进入 S 期。同样的，当肿瘤蛋白存在时，它们通过阻止 pRb 与 E2F 的结合使 pRb 产生与高度磷酸化下同样的后果（图 8.23B)。

虽然上述提供了一个合适的框架，其具体细节更复杂有趣。“E2F”被认为包括一系列异二聚体蛋白，由 E2F1～E2F6 亚基组成，所有这些亚基能够结合 DP1 或 DP2（图 8.23C、D)；家族中另一个成员——E2F7 的功能知之甚少（在下文的讨论中，我们阐述了多种 E2F 亚基的功能，包括推测的与其结合的配体，DP1 或 DP2，相关的生物行为）。一旦二聚体形成，E2F-DP 复合体识别并结合许多基因启动序列中的特异序列元件（TTTCCCGC 或此序列的轻度变异）。

通过本书，我们描绘了转录因子是能够结合基因启动子的蛋白并能促进基因的转录。实际上，像 E2F 一样的转录因子在转录调控过程中执行两种不同的功能：当结合基因启动序列而缺乏任何相关袋蛋白（如 pRb、p107、p130）时，E2F（如 E2F1、2、3）能够通过募集发挥改变染色体构型功能的蛋白以及 RNA 聚合酶来触发基因转录起始。

然而，当 pRb 呈低磷酸化状态时，它能够与已经位于基因启动子区的 E2F 配体结合。一旦与这些 E2F 结合，低磷酸化的 pRb 分子能够封闭 E2F 上的转录活性结构域（见图 8.23D)。与此同时，pRb 募集其他抑制转录的蛋白，其中最重要的是募集组蛋白脱乙酰基酶（histone deacetylase，HDAC）到复合体上；通过水解附近的组蛋白分子上的乙酰基团，HDAC 改变染色体的构型使之不适合转录激活（图 8.24A)。

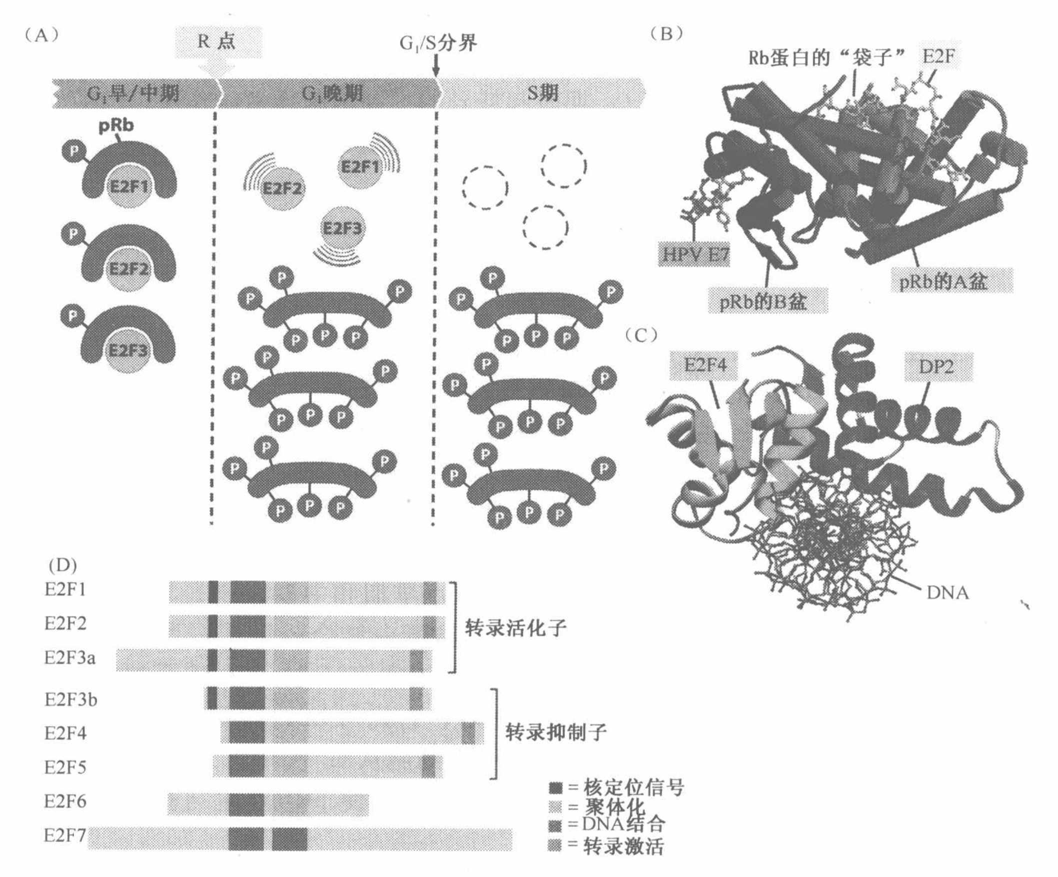


图 8.23 E2F 以及它们的相互作用 (A) 通过结合多种 E2F 转录因子，三种袋蛋白——pRb、p107、p130，调控 E2F 应答基因在许多细胞周期时相中的表达。当 pRb 结合 E2F1、2、3（左）时，阻断它们的转录活性区域；其他参与染色体修饰和转录抑制（没有显示）作用的蛋白与 pRb-E2F 复合体结合。由于它们是通过 E2F 结合到特定基因的启动序列，这些多蛋白复合体抑制这些基因的表达（图中没有显示的 p107 和 p130 的功能与 pRb 相同）。在 R 点被高度磷酸化后，袋蛋白释放 E2F，使后者激活那些基因的转录。随着细胞进入 S 期（右），E2F 失活和（或）降解。因此，E2F 仅在 G_1 晚期从 R 点到刚进入 S 期的短暂时间段内发挥激活基因转录的作用。(B) E2F，如 E2F2（黄色短柱体表示）与 pRb（红色和蓝色）的结合被多种 DNA 肿瘤病毒编码蛋白阻断。图中可见 HPV E7 癌蛋白片段（绿色短柱体表示，左）结合到 pRb 的蛋白小沟（红色区域，左；同样见于图 8.21C）；这种结合，包括其他次级结合位点（图中未标明），通过 pRb 上的 B 盆（红色）和 A 盆（蓝色）干扰"袋子"的形成，从而阻断 E2F2（黄色）的转录活性区（C 端）与袋蛋白的结合。缺乏 E2F 的结合干扰了 pRb 抑制细胞周期进程的作用。图中圆柱体表示双螺旋。(C) 结合 DNA 的 E2F 转录因子与 DP 蛋白形成异二聚体。图中 E2F4-DP2 复合体与 DNA 双螺旋（短柱体，深绿色，红色）的结合通过 X 射线衍射晶体法显示。E2F4 转录因子在左边（浅蓝色，绿色），DP2 在右边（深蓝色，粉红色），都用曲线表示。(D) E2F 组成一个至少包含 7 个独立成员的蛋白家族。E2F1、2、3a 具有转录活性；E2F3b（来源于 E2F3a mRNA 前体的选择性剪接）、E2F4、E2F5 参与转录抑制；E2F6、E2F7 的功能不确定。 (B，courtesy of Y. Cho，from C. Lee et al.，Genes Dev. 16：3199-3212，2002；C，courtesy of R. Latek，from N. Zheng et al.，Genes Dev. 13：666-674，1999；D，courtesy of A. Aslanian，P. J. Iaquinta，and J. A. Lees.）

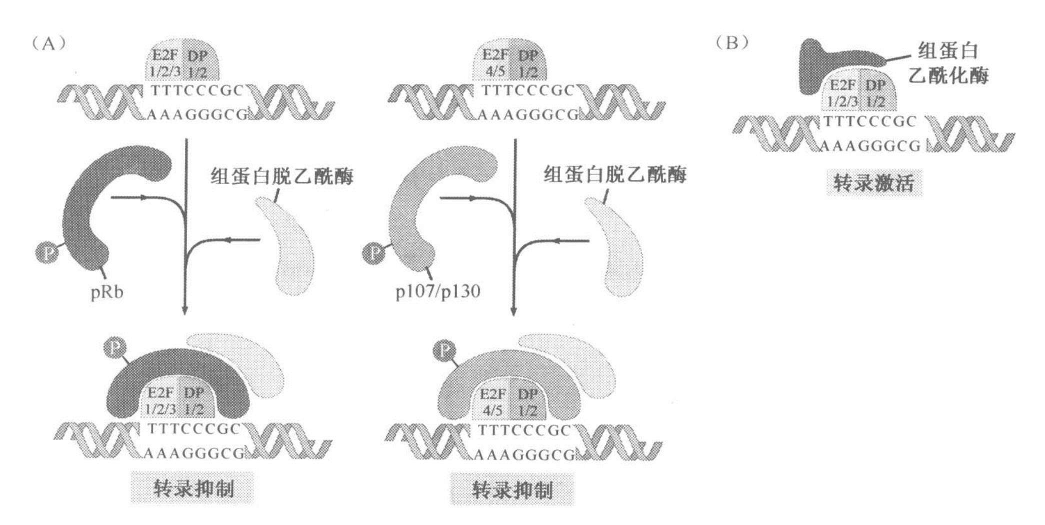


图 8.24　袋蛋白介导染色体构型改变　(A) 高度去磷酸化的 pRb 通过募集 HDAC 酶 (灰色) 到 pRb-E2F 复合体并随之到基因启动区域来抑制基因的转录；这些酶能够水解附近组蛋白上的乙酰基团，导致组蛋白的构型向抑制 RNA 聚合酶通过染色体的方向改变，从而抑制基因转录。(B) 相反，当 E2F 没有与 pRb (或其同源蛋白 p107、p130) 形成复合体时，它们能募集组蛋白乙酰转移酶 (红色)，后者能使染色体的构型有利于转录起始。

这意味着当与 E2F 的转录活性区域发生物理性结合时，pRb 实际上起转录抑制功能。E2F4 和 E2F5 主要参与基因的表达抑制，通过结合 p107 和 p130 蛋白诱导转录抑制因子到基因的启动子区从而下调基因的表达。E2F6 不与袋蛋白结合，它能够单独起转录抑制作用。

处于休眠状态的 G_0 期细胞，E2F4 和 E2F5 高表达 (并且与 p130 大量结合)，相反，在增殖细胞中高表达的 E2F1、2 和 3 几乎不存在。此外，遗传上丢失 E2F4 和 E2F5 的细胞丧失对 $p16^{INK4A}$ CDK (p16 INK4 蛋白细胞周期素依赖的蛋白激酶) 抑制因子的生长抑制效应的反应性。这暗示着抑制周期素 D-CDK4/6 复合体和阻断袋蛋白磷酸化的大部分下游效应是通过这两个 E2F 与 p107、p130 的结合介导的。最终，这种结合的结果是阻遏启动子区带有 TTTCCCGC 序列的基因。

一经高磷酸化，pRb 释放 E2F 复合体，然后 E2F 吸引转录激活蛋白，如组蛋白乙酰化酶，它的作用是修饰组蛋白使之处于促进转录的构型 (图 8.24B)。一系列已知的和假定的在 G_1 晚期特异表达对进入 S 期非常重要的基因，在它们的启动子区都具有 E2F 结合位点。包括一些编码参与 DNA 前体核苷酸合成的蛋白质 (如二氢叶酸合成酶和胸苷激酶)，和其他一些直接参与 DNA 复制的基因。

E2F 活化的基因中最显著的是编码 cyclin E 的基因。其结果是通过 R 点以后 cyclin E 的 mRNA 和蛋白水平都显著增高。这是因为部分 cyclin E 与 CDK2 一起促进 pRb 的高度磷酸化。由此 pRb 的失活使 cyclin E 的水平升高，并且，cyclin E 一经形成将使 pRb 进一步失活 (图 8.25A)。这种关系能够产生一个强大的、自我补充的正反馈回路在细胞通过 R 点时触发 (这种调节也被称作“前馈环”)。

另一种正反馈回路在 R 点被活化是通过如下机制：cyclin E-CDK2 复合体磷酸化

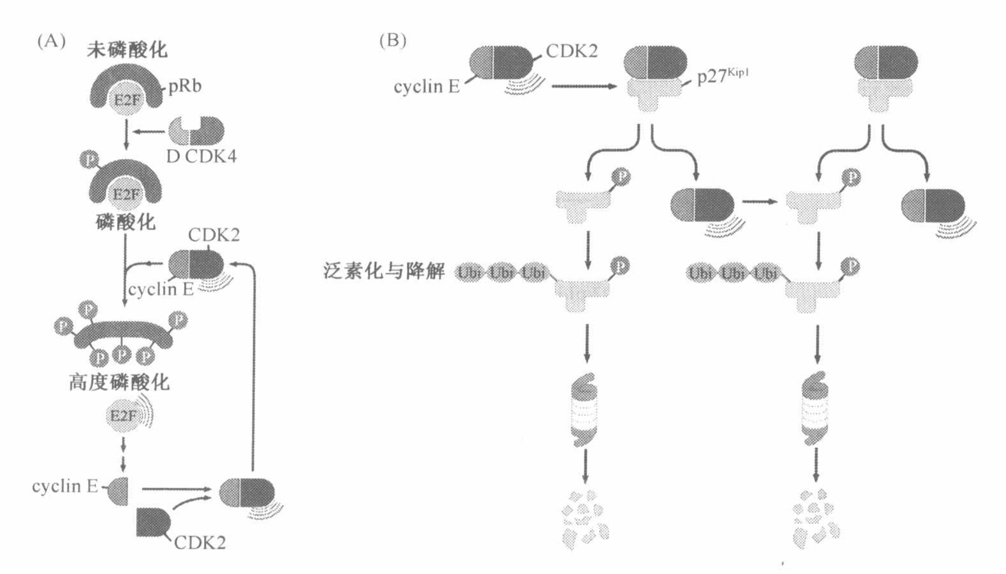


图 8.25 正反馈回路和不可逆的细胞周期进程 正反馈回路的活化确保在细胞周期中几个不可逆的关键点和通过它们的速度。(A) 当 E-CDK2 复合体促进 pRb 的高磷酸化，使 E2F 转录因子从 pRb 上释放出来，E2F 能增加 cyclin E 基因的转录；从而产生更多的 cyclin E 蛋白，形成更多的 E-CDK2 复合体，反过来又促进其他 pRb 的磷酸化。(B) 一小部分 E-CDK2 复合体的磷酸化能随后活化 $p27^{Kip1}$，为其泛素化做准备。$p27^{Kip1}$ 的降解使更多的 E-CDK2 从 $p27^{Kip1}$ 的抑制中释放出来，在这过程中使其作用不断地被放大。

$p27^{Kip1}$，后者磷酸化后，就被泛素化并迅速降解（图 8.25B）。$p27^{Kip1}$ 分子的降解使其他的 cyclin E-CDK2 复合体解离，促进 $p27^{Kip1}$ 磷酸化从而使其他的 $p27^{Kip1}$ 分子失活。这种正反馈机制存在于很多控制回路中以确保一次指令的快速完成。同样重要的，它们确保做出一次指令在本质上是不可逆的，这相当精确的符合细胞通过 R 点的行为。

E2F 1、2 和 3 促进转录活化的时间非常短暂（图 8.23A）。时间开始于 R 点，此时 pRB 高度磷酸化并释放 E2F。然后这三种 E2F 开始诱导 G_1 晚期重要基因的表达，其产物为细胞进入 S 期做准备，如前所述。此后很快，当细胞通过 G_1/S 过渡期进入 S 期，cyclin A 活化，并与它的配体 CDK2 一起磷酸化 E2F 和 DP 的异二聚体转录因子的亚基。其结果是使 E2F-DP 复合体解离，伴随着转录激活能力的丧失。同时，E2F1（及可能其他 E2F）被泛素化降解，而功能可能是对抗 E2F 介导的基因活化的 E2F7，表达并阻断剩余的依赖 E2F 的表达，维持到细胞进入 S 期。这些变化有效的抑制 E2F 因子引起的转录活化，E2F 因子作为活化转录因子短暂的闪光瞬间将在下一个细胞周期中的 G_1 末期出现。

已有报道 pRb 能结合许多种转录因子，原则上可能受 pRb 及其磷酸化状态影响。然而在大多数报道中，它们与 pRb 相互作用的详尽功能分析却没有开展。令人信服的结果是，在与 pRb 相结合的转录因子中，E2F 处于中心的、非常重要的地位对于控制细胞周期进程：把 E2F1 蛋白显微注射到一定类型处于血清饥饿休眠的细胞中（G_0 期），这个转录因子可以独自作用，能够诱导细胞进入 G_1 期，并顺延进入 S 期，E2F2 和 E2F3 具有同样的能力。

8.8 多种丝裂信号途径控制 pRb 的磷酸化状态

在这一章中我们着重介绍了很多不同的信号通路会聚在细胞周期时相并调节它的功能。作为中心信息交换站，时钟装置收集并呈递这些不同的传入信号，继而，通过 cyclin-CDK 复合体发出信号以推动细胞周期的进程（见图 8.1）。值得一提的是这些各种各样的信号调节不同的细胞周期点。这些信号中最显著的与核调节结构相交叠是通过促有丝分裂信号通路传递的。因为所有类型的肿瘤细胞中有过多的信号流通过这些通路，所以这些通路与细胞周期时相的连接对于我们理解细胞转化和肿瘤发生具有关键性的意义。

有丝分裂信号通过转导最终的结果使 pRb 高磷酸化。这种磷酸化的启动是通过诱导编码 D 型细胞周期蛋白的基因的表达，特别是 cyclin D1。当 Ras 信号被阻断［通过注射**显性负性突变体**（dominant negative mutant）Ras 蛋白］，暴露于血清中的，野生型的细胞增殖被阻断，而突变的 $Rb^{-/-}$ 细胞因缺乏 Ras 的作用而照常进入 S 期。这表明 Ras 的主要功能发生在 G_1 期以确保有丝分裂信号释放，通过生长因子受体配基活化引起 pRb 的磷酸化和功能失活。此外，通过异位表达 cyclin E 或 E2F1 基因能够防止显性负性蛋白导致的 S 期阻断。以上这些意味着一个直线的指令链，即
生长因子→生长因子受体→Ras→cyclin D1 和 E→pRb 失活→E2F 活化→进入 S 期。

促有丝分裂生长因子增加 cyclin D 水平的能力依赖于几个不同的信号通路（图 8.26；8.3 节；表 8.1），其中研究较透彻的是通过 Ras→Raf→MAPK 通路（6.5 节），如许多 Fos 家族的转录因子，处于这一信号级联放大的底层（表 6.1），产生 AP-1 与 Jun 蛋白复合体的异二聚体；这些 AP-1 复合体是已知的 cyclin D1 基因转录强大的活化剂。另外，很多胞质内信号转导蛋白影响 cyclin D1 启动子途径目前还知之甚少（表 8.1）。

如前所述，cyclin D2 和 D3 启动子有自己的上游调节序列用以对胞外信号做出反应。很多信号转导途径会聚在这两个基因启动子上在肿瘤细胞中失控，从而导致某一种 cyclin D 的过度表达，pRb 不适当的磷酸化和失活，细胞丧失对增殖的调控。

Ras 信号转导通路的活化通过磷脂酰肌醇(-3)激酶（PI3K）使 Akt/PKB 激酶活化；后者继续磷酸化并使糖原合成酶-3β 失活（GSK-3β，6.10 节；图 8.26）。这对促生长有一定的帮助。正常情况下，GSK-3β 作用于 β-catenin 分子，使之磷酸化后被破坏；这种磷酸化的结果是使 β-catenin 分子泛素化并在蛋白酶体中降解。然而，当 Akt/PKB 磷酸化后 GSK-3β 失活，β-catenin 堆积并向细胞核移位，在核内与 Tcf/Lef 一起形成转录因子复合体促进 cyclin D 转录。另一种可能是 Writ 生长因子（6.10 节）通过抑制 GSK-3β 活性对细胞周期调控产生同样的作用。

其他一些有丝分裂信号对细胞周期中特殊的元件起作用，使这一过程更加复杂。例如，在一些不是很确切了解的途径中，持续暴露在血清生长因子下引起细胞池中 $p27^{Kip1}$ CDK 抑制因子降解，结果是 $p27^{Kip1}$ 蛋白总体水平在 S 期内进一步降低［细胞中缺失 $p27^{Kip1}$ 与 cyclin D1-CDK4/6 复合体螯合的 $p27^{Kip1}$ 协同作用（图 8.17），使一部分 cyclin E-CDK2 从 $p27^{Kip1}$ 抑制中释放出来，在 G_1 末期将触发 R 点转换的开始］。

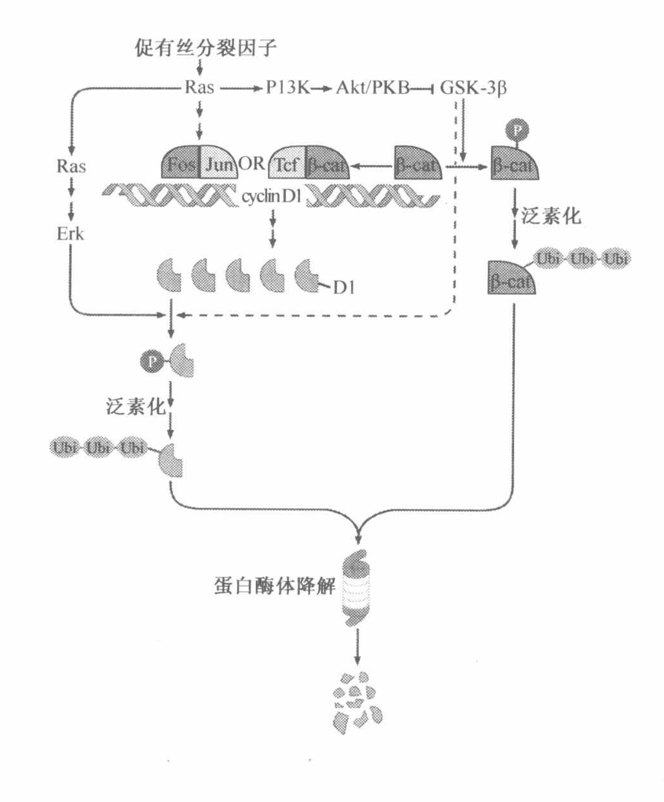


图 8.26　cyclin D1 水平抵消控制　多种信号转导通路调控 cyclin D1 的水平。例如，Ras 通路通过至少三种方式影响 cyclin D1 的水平：①转录因子 AP-1 作用在 cyclin D1 的启动子上，增加 cyclin D1 mRNA 水平；AP-1 是由 Fos-Jun 组成的异二聚体这两者在促有丝分裂剂的作用下数量增加和（或）功能上活化（中间上部；图 8.11）。②通过活化 P13 激酶和 Akt/PKB，Ras 能够抑制 GSK-3β 的作用。进而使 β-catenin（β-cat）免于磷酸化，泛素化和降解，使之与转录因子 Tcf 一起诱导 cyclin D1 转录。③Erk 是从反方向起作用，它处于 Ras → Raf → MEK → Erk 激酶级联反应的底层（6.5 节）。cyclin D1 被 Erk 磷酸化（图左侧）从而在蛋白酶体中被泛素化降解。第四种联系已经报道，是通过 GSK-3β 磷酸化 cyclin D1，同样使之泛素化和降解（阴影线）；总之，Ras 对 cyclin D1 的作用累积（一般来说，Ras 途径增加 cyclin D1 水平比使之降解的作用要大）。

还有其他一些未知的机制能够使促有丝分裂生长因子激活细胞周期装置。例如，在有丝分裂信号中 cyclin D 与 CDK4 的自然结合是依赖性的，但其原因却未知。揭示这种其他生长促进信号与细胞周期之间的联系一定会在未来的实验中实现。

8.9　癌蛋白 Myc 干扰 pRb 的磷酸化使之失去对细胞周期进展的调控

在前面的章节里，我们描述了在癌细胞中过度的有丝分裂信号导致 cyclin D 水平的升高进而引起 pRb 的磷酸化和功能的失活。先前的研究中我们已经知道在人类的肿瘤细胞中存在另外两条途径引起 pRb 功能缺失：*Rb* 基因突变导致 pRb 功能缺失，见于视网膜母细胞瘤、骨肉瘤和小细胞型肺癌中。同样的情况出现在被人乳头状瘤病毒（HPV）感染和转化的细胞中；pRb 结合癌蛋白 E7（图 8.21C 和图 8.23B）在绝大多数宫颈癌发生中（>99.7%）起关键性作用。就我们目前所知的，人类肿瘤细胞通过多种机制逃避细胞周期的调控。

我们从 Myc 蛋白开始讲起，当它的表达脱离调控时是一种癌蛋白。在 15%～30% 人类癌中 *Myc* 基因表达异常，使 Myc 蛋白水平升高。Myc 蛋白的作用与我们在第 4～6 章提到的大多数的癌蛋白不同。其他的癌蛋白特别是 Ras 和 Src 蛋白，它的作用方式是向细胞膜富集并触发复杂的信号级联反应，活化胞质的信号转导蛋白，最终活化核内的

转录因子。Myc 因发现存在于细胞核内，在此它是作为生长促进转录因子。

Myc 是 bHLH 转录因子超家族的一员。它们的命名是因为它们具有相同的三维结构，包括一个 DNA 结合域其后的氨基酸序列形成一个 α 螺旋、一个环和另一个 α 螺旋。这一家族中的转录因子与自身或家族中的其他转录因子形成同源或异源二聚体。然后二聚体复合物可以结合特殊的调控序列，称为 E-box（CACGTG），存在于它们调控的靶基因的启动子区（图 8.27）。

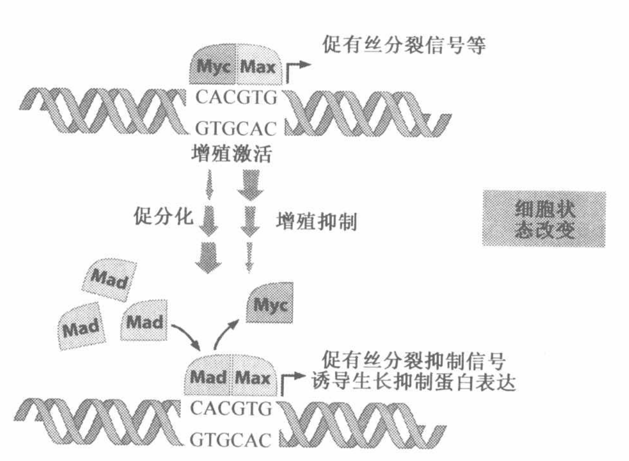


图 8.27 Myc 转录因子 Myc 属于 bHLH 转录因子家族（碱性的螺旋-环-螺旋）以异二聚体的形式调控一大群含有 E-box 序列靶基因的转录。Myc-Max 复合体促进靶基因转录而 Mad-Max 则抑制大多数靶基因的转录。当细胞分化时，Mad 的水平逐渐升高，并引起 Myc 转位，结果使阻遏分化的 Myc-Max 复合体解离。

Myc 作为转录激活因子是增强还是抑制的作用决定于它以及其与伴侣 bHLH 结合的水平。Myc 蛋白的磷酸化同样调节它的功能和稳定性。当 Myc 与 Max（是一个 bHLH）结合，形成的 Myc-Max 异二聚体转录因子促进一大群靶基因的表达。这些基因的许多产物进而有效地影响细胞周期，有利于细胞增殖（虽然 Myc 的水平受有丝分裂信号的强烈影响，但 Max 的水平在细胞中保持相对恒定。因此，当正常细胞用含有促有丝分裂剂的血清培养时，Myc 的水平达到正常，相反，当撤除血清中的促有丝分裂剂时 Myc 的水平骤降。这就意味着 Myc-Max 异二聚体的水平不断地被正常细胞接受到的有丝分裂信号流量的调控）。

正如这一章后面提到的，一些 bHLH 蛋白同样以适合的水平参与一定的组织特异的分化过程。通过中间物，Myc 能够阻止其他来自于执行各种不同的分化过程的 bHLH 转录因子。结果，Myc 能同时促进细胞增殖和抑制细胞分化；这是一个精确的生物学行为伴随着活跃的生长细胞但还没进入有丝分裂后期的分化阶段。然而，当细胞减慢增殖并开始分化，Myc-Max 复合体解离，随后 Mad（另一种 bHLH 伴侣）蛋白水平升高使 Myc 从 Myc-Max 复合体上移位（图 8.27）。Mad-Max 复合体是转录阻遏物，能使人类很多组织细胞进入有丝分裂后期的分化阶段。

Myc 与细胞周期调节器紧密相互作用。首先发现于一对癌基因可以相互作用使啮齿类动物细胞转化成致瘤状态。我们将在第 11 章介绍癌基因的相互作用。在此，可以肯定地说 *ras* 和 *myc* 高度有效的协同效应作用于细胞转化，意味着它们具有独自的方式完成这一过程。类似的，癌基因 *ras* 和腺病毒癌基因 E1A 协同作用于细胞转化。这些发现表明在这一实验背景下 *ras* 和 E1A 有类似的作用。但它们如何作用的详细情况还是个谜。

事实上癌蛋白 E1A 与 p107 和 p130 一起结合 pRb 并使之失活（8.5 节）意味着 Myc 蛋白对这些重要细胞蛋白具有相似的作用，特别是 pRb。但是，Myc 与 pRb 直接联系已经被排除。我们已经了解 Myc 能够调控很多其他重要的细胞周期元件的表达。当这些元件被 *myc* 基因产生的 Myc 蛋白异常高表达驱动时，由此产生的生理状态类似于缺乏 pRb 功能的细胞。这两种改变使细胞脱离进入 G_1 期正常的周期调控而异常通过 R 点。

Myc 的一个靶基因是 cyclin D2（图 8.28），它的高表达进而引起 pRb 的磷酸化。Myc 也可以促进 CDK4 基因的表达，CDK4 水平增高能够形成 cyclin D-CDK4 复合物从而磷酸化 pRb，同时，分离 $p27^{KiP1}$ CDK 抑制因子，释放 cyclin E-CDK2 复合体（图 8.17）。Myc 同样可以促进 Cull 蛋白的表达，Cull 蛋白在 $p27^{KiP1}$ CDK 抑制因子泛素化降解途径中起重要作用。Myc 以不同种方式促进基因表达的变化推动细胞通过 G_1 期。

通过与第二种转录因子 Miz-1 的共同作用，Myc 也可以作为转录抑制物发挥作用（图 8.28）。在这个作用里，Myc 能抑制编码 $p15^{INK4B}$ 和 $p21^{Cipl}$ CDK 抑制因子基因的表达，这两者分别抑制 CDK4/6 和 CDK2 的功能。事实上，正如我们后面将提到的，TGF-β 利用这两个 CDK 抑制因子阻断细胞通过 G_1 期。因此，通过保护这两个 CDK 抑制因子的表达，Myc 参与对抗生长抑制剂 TGF-β 的作用。这代表一个重要的途径，肿瘤细胞在 TGF-β 存在的环境下持续增殖而正常的情况是增殖被抑制。

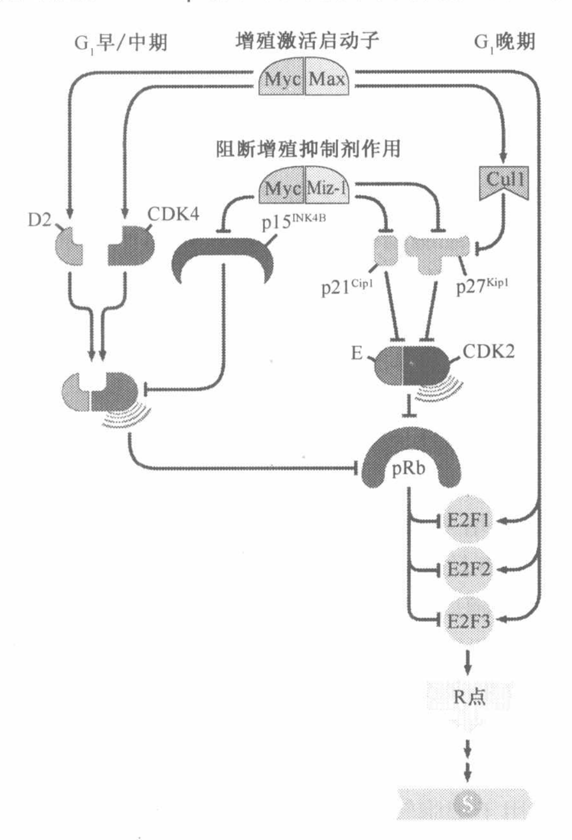


图 8.28 Myc 对细胞周期时钟的作用 Myc 与 Max 伴侣共同作用（上方），能够调节许多正性和负性细胞周期调节器的作用。例如，Myc-Max 异源二聚体能够诱导促生长蛋白 cyclin D2 和 CDK4 的表达（左侧），它们在 G_1 早期起作用。同时，通过 Cull（$p27^{Kip1}$ CDK 负责降解抑制剂；右上方）和 E2F1、2 和 3（右下方）的表达增高，Myc 的作用持续到 S 期。此外，Myc 与 Miz-1 共同作用，能够抑制 $p15^{INK4B}$、$p21^{Cipl}$ 和 $p27^{Kip1}$ CDK 抑制因子的表达；在 G_1 早、中、晚期均起作用。

最后，Myc 能够诱导编码 E2F1、E2F2 和 E2F3 转录因子蛋白的基因表达。如前面提到的，这些 E2F 转录因子被 pRb 和它的两个同系物负性调节。通过引起促生长转录

因子在细胞内的堆积，Myc 再一次打破维持细胞增殖的平衡。

现在让我们来了解一下癌蛋白 Myc 是如何有效地打破细胞增殖的调控。它可以到达和推动多种细胞周期调节器。结果是改变主要蛋白的表达水平，打破促进生长和抑制生长机制的平衡，使 pRb 失活和细胞生长。此外，Myc 也可以影响细胞系的长期的增殖，这与它影响细胞周期无关（信息栏 8.5）。

信息栏 8.5　Myc 也可以对细胞增殖起长效作用　Myc 癌蛋白能够动态地解除细胞周期调控机制，从而使细胞容易通过生长-分化周期。Myc 也可以通过其他不相关的途径影响细胞增殖。在随后的第 10 章中，我们将获知正常细胞群在增殖抑制前只有极小的一部分细胞能够通过有限的细胞周期，这种结果能够被端粒酶的作用逆转。通过与编码人类端粒酶重要亚基的基因启动子区的 E-box 结合，Myc 能够增强这些端粒酶在一定细胞系中的表达，从而使之通过正常情况下被阻断的生长-分化环。

这一节里描述了很多 Myc 扰乱细胞周期成分的作用，详细地阐述了逃逸细胞增殖控制的能力，对于肿瘤发生非常重要。Myc 蛋白的作用阐述了细胞生理学的一般原理，影响本文的很多讨论。重申一遍，我们参照类似 Myc 的蛋白启动或关闭下游靶基因的事实。而如此的表达也发生在活细胞中。事实上，大多数调节器不是通过开关的完全开或关来控制，而是增加或降低下游靶的水平，而通常是增加。实际上，它们是重新设定调控点，由此来改变信号途径的平衡进而促进或抑制一定的细胞反应。

有效的图示说明 Myc 的促有丝分裂能力来自于一个实验，在这个实验中 Myc 设计成持续高水平表达，但是与雌激素受体（ER）形成融合蛋白。当缺乏雌激素受体的配体时，如雌激素或三苯氧胺，Myc-ER 融合蛋白在细胞质中处于失活的功能状态。然而，当添加配基时这种融合蛋白从失活状态恢复过来，迅速入核并且像正常的 Myc 转录

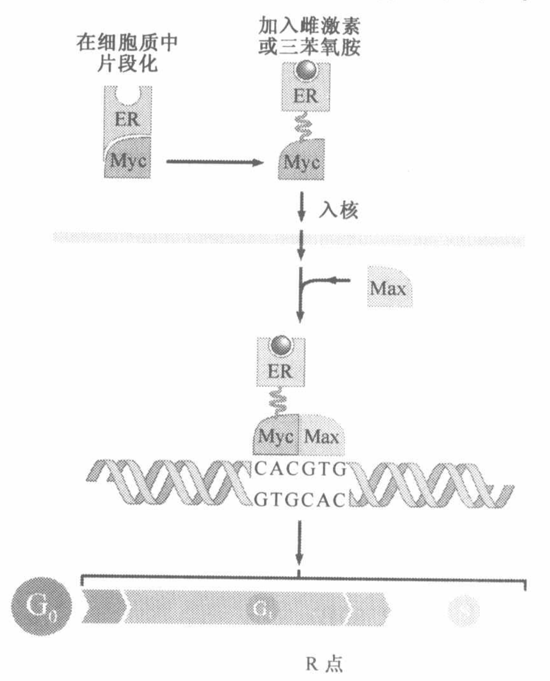


图 8.29　癌蛋白 Myc 的效应　Myc 蛋白的广泛作用可以通过如下实验来说明，在这个实验中 Myc 与雌激素受体（ER）形成融和蛋白（蓝色）。在缺乏 ER 的配体（如雌激素或三苯氧胺）时，Myc-ER 融合蛋白滞留在细胞质中（通过与热休克蛋白结合，图中未示）。当向细胞中加入 ER 的配体——雌激素或三苯氧胺（紫色小球）时，Myc-ER 融合蛋白转移入核，与 Max 结合并且迅速活化 Myc 的靶基因。这种活化作用能使血清饥饿的细胞从 G_0 期进入活性的细胞周期，通过 G_1 期进入 S 期。

因子起作用。处于休眠状态的血清饥饿细胞（G_0 状态）表达 Myc-ER 融合蛋白被给予雌激素或三苯氧胺（在血清缺乏的培养基中），这些细胞被诱导进入 G_1 期进而进入 S 期(图 8.29)。这个例子说明，Myc 在缺乏血清有丝分裂的情况下独自作用，能够解除使细胞停留在 G_0 期的所有限制从而促使这些细胞进入 G_1 期——这通常需要大量强烈的生长因子的刺激。除了 Myc，还有许多其他的转录因子表现为长效的癌蛋白（信息栏 8.6）。

信息栏 8.6　许多癌蛋白作为转录因子而发挥作用　Myc 只是转录因子活性家族中具有癌蛋白功能的成员之一（表 8.2）。我们第一次提到这类癌蛋白是在早期基因 *myc*、*fos* 和 *jun*（6.1 节），它们每个都可以编码一个转录因子，且都具有癌蛋白功能。随后，我们提到 STAT 蛋白（6.8 节）、NF-κB、Notch 和 Gli（6.12 节），它们也可以发挥这样的双重作用。这些不同的转录因子作用于不同的靶基因诱导细胞表型的转化。

对于这些转录因子作用的靶基因目前还知之甚少。由于在实验水平上缺乏进一步的事实来证明，导致最终很难确定一个转录因子结合的启动子。近年来发展起来的染色质免疫沉淀（ChIP）实验为解决这一难题带来了希望。在 ChIP 实验过程中，染色质（包含 DNA 和通过化学偶联在 DNA 上的相关蛋白）被机械地分割成小片段。然后用转录因子特异抗体与这些染色体片段进行免疫共沉淀，从而获得与转录因子结合的相关 DNA 片段。把 DNA 分子从沉淀中萃取出来并进行 PCR 扩增。得到的序列与现有的人类或小鼠的基因组序列进行比对，最终确定转录因子结合的基因启动子，通过该结合使之活化或抑制。

针对多种转录因子的 ChIP 技术的广泛应用有助于确定这些癌蛋白转录因子激活或抑制的靶基因。

表 8.2　代表性的一类编码致癌的转录因子

转录因子	代表基因
亮氨酸拉链＋基本 DNA 结合结构域	*fos*,*jun*
螺旋-环-螺旋	*myc*,*N-myc*,*L-myc*,*tal*,*sci*
锌指结构	*myl/RARa*,*erbA*,*evi-1*, *gli-1*
类似结构域	*pbx*, *Hox2.4*
其他	*myb*,*rel*,*ets-1*,*ets-2*,*fli-1*,*spi-1*,*ski*

基因是安排编码蛋白的结构进行分类。

改编自 T. Hunter，Cell 64:249-270,1991.

Myc 也作用于其他靶基因，调控细胞周期外的结构（图 8.30A）。分析果蝇属和哺乳动物细胞发现 Myc 与每一种类型细胞的基因组中 12%～15%基因有相互作用（目前还不知道 Myc 调控多少基因，估计在一个正常哺乳动物细胞中只存在 1000 个 Myc 分子）。在果蝇属里，检测这些基因发现 Myc 广泛作用于细胞促进细胞生长，简而言之，即增加细胞的大小。意味着在哺乳动物细胞中有同样的作用：如果人类细胞只在细胞体积很小时不能进入细胞周期，Myc 能通过增加细胞的大小促进细胞增殖。这种作用与前面提到的 Myc 的功能协同作用，调节细胞周期重要的蛋白，使细胞通过 R 点。联系癌的发生，Myc 可能还具有其他生物学功能，一个发现是它可以影响胚胎干细胞（ES）的肿瘤发生（图 8.30B）。

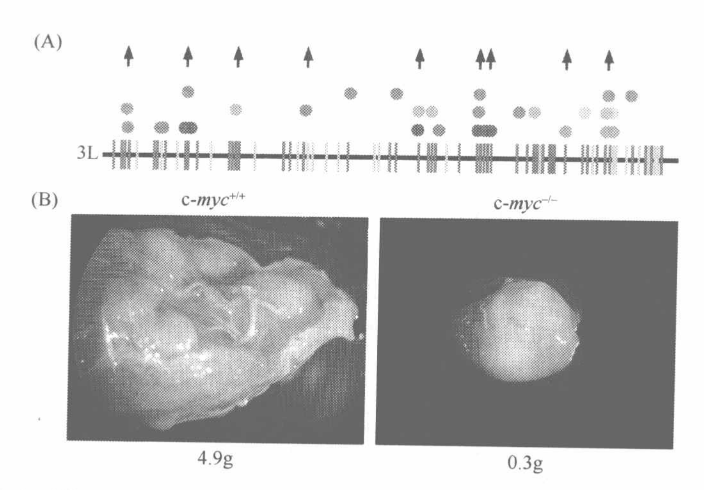


图 8.30 Myc 的广泛作用 除了对细胞周期的影响，Myc 还以不同的途径作用于细胞。(A) 在果蝇细胞中针对 Myc、Max 和 Mad-相关 Mnt 转录因子的作用靶基因的系统研究表明，它们的数目很多并且分散在果蝇的 4 条染色体上。虽然在整个基因组范围内调查了 Myc 的结合位点，在此我们只标出了 3 号染色体长臂（3L）。这一研究分析了果蝇 Myc（绿色圆圈）、Mad 样 Mnt（红色圆圈）和 Max（蓝色圆圈）结合 DNA 的特异片段。总之，研究结果表明大约有 2000 个果蝇基因启动子与一种或多种 bHLH 蛋白结合；其中大部分启动子与被一对 bHLH 转录因子上调或下调的基因相关。许多基因是哺乳动物基因的类似物并且在哺乳动物细胞中是 Myc 的靶基因，图中黑色箭头所示。(B) Myc 多效作用的其他证据来自于生物学实验。例如，在小鼠胚胎干细胞（ES）致瘤实验中，野生型的 ES 细胞（左侧，c-*myc*$^{+/+}$）形成巨大的血管瘤（橘黄色的血管），然而，缺乏 Myc 功能的细胞（右侧，c-*myc*$^{-/-}$）生长缓慢，其原因主要是由于不能形成充足的血供；两种细胞系在体外生长速度相同。(A, adapted from A. Orian et al., Genes Dev. 17：1101-1114，2003；B，from T. A. Baudino et al., Genes Dev. 19：2530-2543，2002.)

8.10 TGF-β 抑制 pRb 的磷酸化从而引起细胞周期阻滞

TGF-β 是正常细胞主要的生长抑制信号，特别是上皮细胞，防止转化成癌细胞。我们将在后面讲到 TGF-β 还存在其他的相当独特的作用，促使细胞改变分化方式。通常情况是改变细胞的表型使其向肿瘤转化，这些表型的改变使癌细胞呈现黏着性下降（补充材料 5 ◎），并具有锚定非依赖性、血管源性，甚至侵袭性。

TGF-β 有两种主要的作用：一种是抵抗，另一种是促进肿瘤细胞生长，两种作用相互影响。癌细胞通过逃避 TGF-β 的抑制细胞效应同时保留它的促进细胞生长的效应，避免了这两种对立的作用。特别地促进了肿瘤细胞的浸润。在意料之中，TGF-β 的细胞生长抑制作用来自于直接和间接作用于 pRb 这个决定细胞增殖与否的中心调节器。

我们先前提到 TGF-β 单独作为独特的受体，利用胞浆区的丝氨酸-苏氨酸激酶（而不是酪氨酸激酶）发出信号。目前证实这些信号作用的靶蛋白主要是 Smad 转录因子家族。一旦被 TGF-β 受体磷酸化，Smad2（或 Smad3）蛋白分子结合 Smad4 蛋白（它不是 TGF-β 受体的底物），结果是异二聚体蛋白复合物入核，在核内起到转录因子的作用（图 6.29D）。

在细胞调控中，TGF-β 最主要作用于编码两个 CDK 抑制因子的基因，即 p15^{INK4B}

和 p21^{Cip1}（图 8. 14A）。它们在启动子区都含有 CAGAC 序列，吸引 Smad3-Smad4 异源二聚体转录因子复合物。而 Smad 复合物不能独自活化这些基因的转录。它必须与另外一种结合在邻近这两个基因启动子区 DNA 序列的转录因子——Miz-1 结合，从而激活它们的转录（图 8. 31，左侧）。

前面我们也提到癌蛋白 Myc 相反的作用，通过与 Miz-1 结合，能阻断这两种 CDK 抑制剂的诱导作用。通过抑制编码 p15^{INK4B}和 p21^{Cip1}的基因表达，Myc 消除了细胞周期进程中的两个主要障碍（图 8. 28）。这从不同的角度说明了 *Myc* 癌基因引起的高水平 Myc 蛋白确保这两种 CDK 抑制剂被强烈的抑制，从而为细胞周期的进展铺路。

在正常细胞中，TGF-β 需要最后一个指令来决定细胞是否增殖。为此，TGF-β 必须压倒 Myc 可能释放的任何矛盾的信号。为了完成这一过程，TGF-β 必须确保 Myc 不阻碍活化 p15^{INK4B}和 p21^{Cip1} CDK 抑制因子。所以，在正常细胞，TGF-β 通过阻断 *Myc* 原癌基因的表达而使 Myc 远离这两个基因的启动子区（图 8. 31，右侧）。*Myc* 基因启动子区有 TGF-β 活化的 Smad3 转录因子结合的序列。邻近这一序列还有另外一个可以结合 E2F4 或 E2F5 这两个 E2F 转录因子的序列来抑制转录（8. 7 节）。通过与 E2F4/5 和 p107 形成三聚体，Smad3 确保抑制 Myc 转录，从而在细胞调控环中消除 Myc 蛋白的生长促进作用。一旦 TGF-β 成功地将 Myc 从这一环境中移出——从 p15^{INK4B}和 p21^{Cip1} CDK 抑制因子的启动子区——TGF-β 能够利用 Smad3-Smad4 复合物与 Miz-1 一起，活化这两个启动子，从而诱导这两个最重要的 CDK 抑制因子的表达（图 8. 31，左侧）。

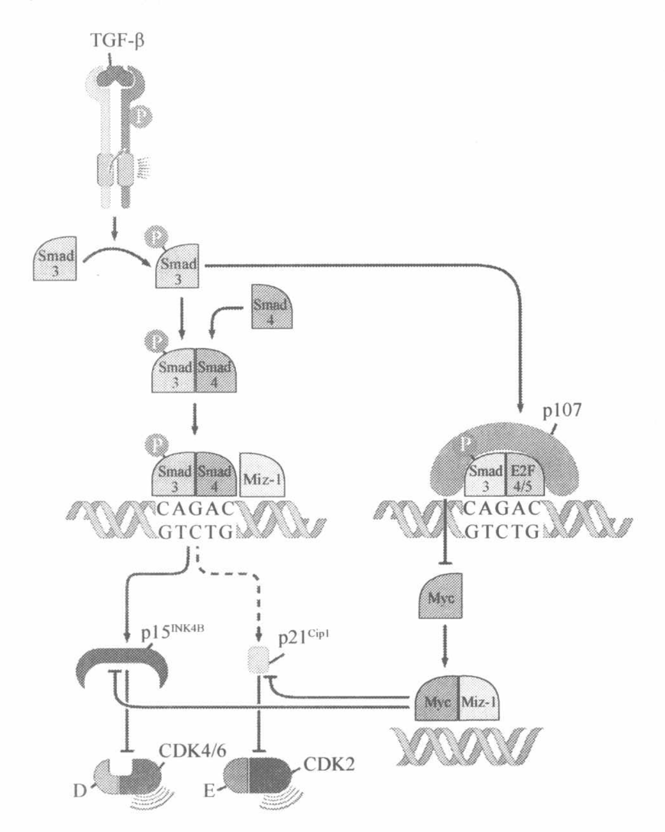


图 8. 31　TGF-β 和 Myc 的作用相反　TGF-β，通过它的受体，磷酸化若干 Smad 蛋白，如图中所示的 Smad3（左上方）（Smad2，未示出，与 Smad3 作用相似）。Smad3 与 Smad4 形成异二聚体后入核，在核内与 Miz-1 共同作用诱导 p15^{INK4A}和（较弱的）p21^{Cip1} CDK 抑制剂的表达。在此过程中，Myc 能与 Miz-1 共同作用抑制这两个 CDK 抑制剂的表达（右下方）。然而，Myc 的作用可以提前被 TGF-β 阻断，TGF-β 输送 Smad3 与 E2F4 或 E2F5 加 p107 形成复合物（pRb 的同系物；右侧）抑制 *myc* 基因的表达，从而使 Myc 的水平急剧降低。这一作用确保 TGF-β 成功诱导这两种 CDK 抑制剂——p15^{INK4A} 和 p21^{Cip1} 的表达，从而在 G_1 早期/中期阻断细胞周期的进程。

许多类型的肿瘤细胞想要顺利生长就必须逃避 TGF-β 的生长抑制作用。特别的是，这些肿瘤细胞依赖于高水平的 Myc 转录因子来促进增殖，因此必须从 TGF-β 的抑制中释放 Myc 转录。这也就说明为什么在 12 例人类乳腺癌细胞中，Myc 在这所有的 12 例中都表达而不再受 TGF-β 抑制，尽管 TGF-β 诱导的反应在其中的 11 例肿瘤中是完整的（因为在这些肿瘤中 *myc* 基因本身是明显的野生型构型，这就意味着一些表达这一基因的转录因子是反常的）。类似地，当突变后形成原癌基因 *myc*，这些基因的启动子发生结构性改变因此不再对 TGF-β 诱导阻遏作用反应。一旦解除了这一阻遏，原癌基因 *myc* 特别是 Myc 产物有利于维持这两个 CDK 抑制剂（如 $p15^{INK4B}$ 和 $p21^{Cip1}$）在一个极低的水平。正如前面所讲的，这有助于在细胞内产生允许快速增殖的环境。

在一个普遍的意义上，癌细胞诱发逃逸 TGF-β 的生长抑制作用，而保留 TGF-β 其他潜在有利的反应。通常逃逸 TGF-β 介导的生长抑制作用是通过是使 pRb 信号途径失活来完成的。结果，正常细胞 pRb 作为对 TGF-β 生长抑制信号引起细胞增殖停滞的标志线。相应的，如果 pRb 从调控环路中通过上述的机制被清除，则 TGF-β 生长抑制的能力极大地降低，因为 TGF-β 诱导的 $p15^{INK4B}$ 未能有效地抑制细胞周期的进程。

一部分 TGF-β 的失活反应仍能完成，例如，通过突变编码 Smad2 蛋白的基因；这一突变经常在结肠癌中被发现。一个相似的部分钝化 TGF-β 诱导的抗促有丝分裂反应是通过癌蛋白 Ski 完成的（表 3.3）。这种蛋白和它的同系物，称为 Sno，能够结合 Smad3-Smad4 转录因子复合物阻断其抑制 myc 转录的作用。

胰腺癌中的 1/2 和多于 1/4 的结肠癌携带突变体，灭活的 Smad4 蛋白。Smad4 表达缺失，Smad2-Smad4 和 Smad3-Smad4 复合物都不能形成。这两种复合物是 TGF-β 受体输送入核的主要因子来完成阻断细胞增殖的任务。

一些类型的癌细胞产生了强有力的长效的逃逸作用，然而它们失去了对 TGF-β 的所有反应性，通过抑制编码 TGF-β 受体的基因。例如，大多数结肠癌遭受“微卫星不稳定性”（一种导致高比例的突变；见 12.9 节）携带突变，使 TGF-βⅡ受体失活。然而获得了逃避 TGF-β 的生长抑制作用的同时，这些肿瘤细胞也放弃了在随后的肿瘤进程中 TGF-β 的潜在的影响，这个过程中 TGF-β 帮助癌细胞获得恶性表型和侵袭能力。

8.11 pRb 的功能与其控制分化是紧密联系的

细胞分化是肿瘤发生的一个至关重要的过程，这在本文中反复被提及。简单地说，遍布全身的细胞能够在两种生长状态中的一种存在。它们在相关未分化阶段保留着对有丝分裂信号引起细胞增殖的选择性；这本质上是干细胞的生物行为。另一种情况是细胞离开这一状态而进入进一步的分化状态，在此细胞停止再次增殖并因此成为有丝分裂后。这一决定控制着细胞生物学中重要的改变，以另一种方式解释了分子控制决定细胞是否保持在活化的生长-分裂周期，可逆地进入 G_0 期，或者不可逆地从这一循环中进入有丝分裂后的分化期。

细胞增殖和细胞分化的对立在多数类型的癌细胞生成中表现的很明显，在此过程中分化被部分或全部阻滞（信息栏 8.7）。了解这些，我们试问在细胞控制环路中这两种独立的变化，在癌细胞形成的过程中必然发生：增殖失控和阻滞分化。这种选择很简

信息栏 8.7　分化阻滞伴随着肿瘤的进展　一些造血系统的肿瘤，特别是白血病可以分为慢性和急性两种形式。这些慢性疾病，例如慢性髓细胞性白血病（CML）是由许多分化成熟的细胞组成并且在很多年里不对生命构成威胁（图 8.32）。对于某些 CML，经过 3～5 年的发展可能突然暴发高度恶变，并进行性地发展成"白血病急性发作"的疾病。这些表现为白血病急性发作的细胞与处于慢性阶段的细胞克隆来源相同，然而，它们分化程度低并不断增殖，成了很难治愈的疾病并威胁生命。

那些慢性疾病的细胞来自于具有自我更新能力的干细胞的突变。但是，这些疾病通常保持相对良性，因为这些突变的细胞分化成为中性粒细胞的过程是正常的。如果此时分化被阻滞（通过目前还不知道的基因改变），细胞将处于低分化的干细胞状态（髓系或红系），而此时的增殖并不能使它们的后代细胞进入高分化的有丝分裂后期的状态。

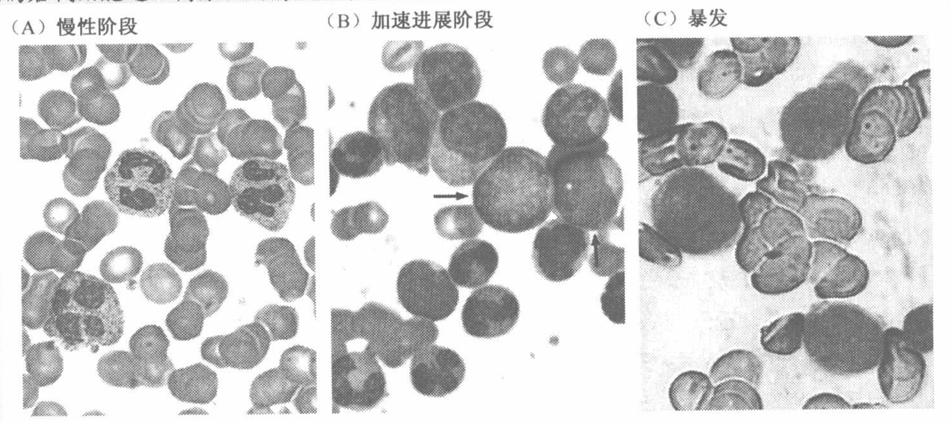


图 8.32　疾病的进展与去分化　(A) 慢性髓细胞性白血病（CML）中累积的细胞几乎都是分化的中性粒细胞（紫色的，复核细胞），粉红色的细胞是红细胞。(B) 几年之后，当慢性疾病发展成急性阶段，高分化的中性粒细胞逐渐被低分化的原始细胞取代（箭头）。(C) 最后，这一急性阶段进入"白血病急性发作"，循环血液中携带大量的未分化原始细胞。这个最后的阶段反应了干细胞的行为已经出现在慢性阶段但阻断分化。(A and B, courtesy of P. G. Maslak; C, courtesy of the American Society of Hematology Image Bank.)

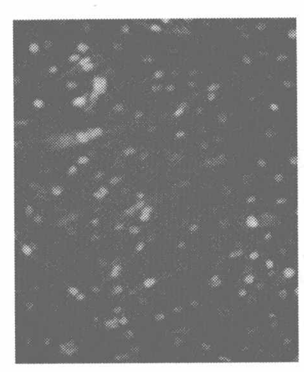




图 8.33　肌原细胞分化成肌细胞　作为肌细胞的低分化前体细胞，肌原细胞可以体外培养并且保持在未分化阶段（左侧）。然而，许多类型的生理信号可以在体外诱导肌原细胞成肌细胞，并由此融合成肌纤维（红色，右侧）。例如，移除血清（培养基中的生长因子导致分化）。很多实验表明通过促进 pRb 的磷酸化和失活能够抑制分化的进行。相反的，抑制 pRb 的磷酸化通常能够诱导细胞分化。(From E. M. Wilson et al. Mol. Biol. Cell 15: 497-505, 2003.)

单：在某种刺激下，细胞发生某一种改变，增殖失控或阻滞分化。

有证据支持后面的观点，这来自于体外的肌细胞分化的研究暗示着在这两个过程的控制机制中有一个紧密的耦合。在这个实验系统中，相对未分化的**肌原细胞**能被诱导成

肌细胞。肌原细胞被强迫阻滞在细胞周期的 G_1 期，通过诱导编码增强 $p16^{INK4A}$ 或 $p21^{Cip1}$ CDK 抑制因子的基因来完成，引起肌原细胞在此条件下分化（如血清中高水平的生长因子）否则不能发生分化。遗传上发生改变的小鼠肌原细胞缺乏 Rb 基因的拷贝，因此不表达 pRb，对分化没有反应（引入 $p16^{INK4A}$ 和 $p21^{Cip1}$ 编码基因产生的诱导作用）。另外，肌原细胞中过度表达 cyclin D1（推动 pRb 的磷酸化和失活）阻断分化经常见于从培养基中撤除生长因子。这些实验表明低磷酸化的 pRb 作用于两种看似不相关的生物学过程——停止肌原细胞的增殖，促进这些细胞分化成肌细胞。

有关细胞周期调控和分化之间的一些其他的分子连接也已经被揭示。因此，增强表达 CDK 抑制因子，如 $p21^{Cip1}$ 或 $p27^{Kip1}$，能够诱导成神经瘤细胞和粒单核细胞白血病细胞的分化，而增强表达 E2F4（抑制性的 E2F；8.7 节）则诱导神经前体细胞的分化。遗传上缺失 E2f4 基因的小鼠（$E2f4^{-/-}$ 基因型）因为红细胞分化缺陷死于妊娠期。C/EBP 转录因子诱导脂肪细胞的分化和 E2F，以及一个特殊的成骨细胞转录因子（CBFA1）结合于 pRb。而维甲酸诱导急性早幼粒细胞性白血病（APL）细胞分化，部分通过触发 cyclin D1 的降解来完成的。

这些不同的实验表明调控 pRb 和它的同系物的磷酸化状态的控制机制，也是分化过程主要的参与者，至少目前的生物学系统研究表明了这些。

此外，一系列的证据表明分化和细胞周期机制之间的联系来自于对 Myc 蛋白的研究。正如前面提到的（8.9 节），Myc 蛋白改变增殖和有丝分裂后的分化之间的平衡而有利于增殖。为了解这些作用，我们需要知道控制分化过程的许多转录因子，如 Myc、bHLH 家族的转录因子。然而，这些 bHLH 蛋白功能与 Myc 不同：它们形成复杂的，组织特异的分化过程，而 Myc 作用相反阻滞细胞分化并促进细胞增殖。伴随着分化的 bHLH 转录因子已经在胚胎发育成不同的细胞系中广泛研究，包括肌肉、神经系统、胰腺和免疫系统的形成。例如，4 种不同的 bHLH 蛋白，称为 MyoD、Myf5、myogenin 和 MRF4 通过控制肌肉分化的不同过程在肌原细胞到肌细胞的分化中发挥作用（图 8.33）。

Myc 增加 Id2 蛋白的产生，后者作为 bHLH 转录因子对抗物作用于分化过程。Id2 是一种关联蛋白（Id1～ Id4），也是 bHLH 转录因子家族成员。然而 Id 蛋白显性负性抑制其他 bHLH 转录因子（图 8.34）。更特别的是，Ids 可以与 bHLH 转录因子形成异二聚体但丧失结合 DNA 的能力（因为它们缺乏 DNA 识别的碱性结构域）。这就解释了 Id 蛋白，如 Id2，如何作为诱导分化的 bHLH 转录因子的抑制剂，由此阻断分化。

Id 蛋白以高水平出现在活跃生长的多种类型的细胞中，并减少这些细胞分化的可能性。通过结合 MyoD，Id 蛋白能阻碍活跃生长的肌原细胞中 MyoD 引起的肌肉分化。然而，在正常的分化过程中，Id 蛋白处于难以检测的低水平，MyoD 得以脱离 Id 的干扰并与 bHLH 结合（称为 E12 和 E47）能活化特异的肌肉分化过程（图 8.34）。我们已经知道在很多细胞系中退出细胞周期进行分化需要 Id 蛋白合成减少，如肌肉、胰腺、乳房上皮细胞、骨髓细胞、红系细胞、心肌细胞、B 细胞、T 细胞和成骨细胞。

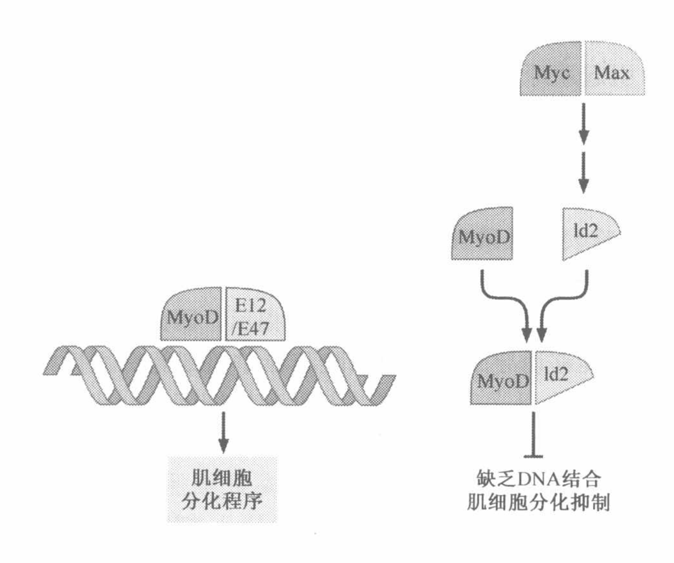


图 8.34 Id 转录因子与分化抑制 谱系特异的 bHLH 转录因子，如 MyoD（粉红色），与广泛表达的 E12 或 E47 bHLH 配偶体（紫色）形成二聚体。其结果是异二聚体在不同的组织中参与分化过程，包括这里表示出的肌肉组织（左侧）。这种功能性异二聚体转录因子的形成能被 Id 蛋白阻滞（浅灰色），Id 蛋白与谱系特异的 bHLH 蛋白形成异二聚体，保护与 E12 或 E47 结合。由于 Id 蛋白缺乏 DNA 结合的结构域，它们作为天然的谱系特异的 bHLH 蛋白"显性负性"抑制剂。某些 Id 蛋白的表达，如图中所示的 Id2 蛋白可以被 Myc 诱导（与它的配偶体 Max；右上方）；这就解释了 Myc 癌蛋白在很多细胞系中能够起到阻断分化的作用。

正如上面所推断出的，Id 蛋白也与癌发生有关。在很多类型的正常细胞中，Id2 分子结合并且和大量的 pRb 分子结合并被其失活。然而，在一种相对常见的儿童肿瘤成神经细胞瘤中，Id2 通常过表达因为它的表达被过多的 N-Myc 推动，N-Myc 是 myc 同系物作用于细胞中的与 myc 相同的靶点（4.5 节）。在成神经细胞瘤细胞中，Id2 积累到一个高水平，大于 pRb 10 倍以上，导致 pRb 不再能够隔绝并且调节这些细胞的 Id2 蛋白。从而它们可以自由地阻断 bHLH 转录因子诱导的分化。

细胞周期中促进生长的元件和分化的结构之间的互抗通过两者的关联得到了进一步解释。例如，在肌原细胞活化的增殖过程中 cyclin E-CDK2 和 cyclin A-CDC2 磷酸化 MyoD，触发它的降解并清除其诱导分化的作用。其他的相互连接不断地被发现。有一篇报道表明 cyclin D1 结合并抑制十二指肠上皮细胞与分化相关蛋白的转录因子。

拮抗作用向相反的方向发展在分化机制的关键组分得以展现。MyoD 蛋白，对于肌肉的分化非常重要，退回细胞周期并且通过产生 pRb 和 $p21^{Cip1}$ CDK 抑制因子而抑制增殖。也有报道 MyoD 可直接结合 CDK4 并抑制它的活性。

前面我们提到当细胞收到促进分化的信号，Myc 的配体，Max 被 Mad 取代，Mad 在分化过程中水平不断升高（图 8.27）。这就产生了细胞周期阻滞并进行分化的状态。由此，Mad-Max 复合物引起 pRb 的两个同系物，p107 和 p130 表达增加。此时，由于 Myc 缺失了 Max 的协同作用，也就丧失对细胞命运的分子调控并因此失去了阻滞分化的能力。

一个生动的例子来自于小鼠肝癌发生的模型能说明 Myc 癌蛋白和细胞分化之间的对抗作用，这依赖于肝细胞中靶向表达 *myc* 转基因。大量的肝细胞癌形成，而当 *myc* 转基因被撤除质就停止。同时，很多先前缺乏正常肝细胞特征的癌细胞，迅速分化成正常形态的肝细胞再生成有组织学特性的肝脏。

这些不同的细胞分化的调控元件包括 pRb、Myc、Id 和其他的调控蛋白参与癌的发生，由高分化细胞形成的肿瘤有较低的侵袭性而由低分化的细胞形成的肿瘤有较高的侵袭性，且患者预后较差。

8.12 pRb 功能在很多人类癌症中失控

pRb 途径的失调所导致的增殖失控是构成完整的癌细胞表型所必需的。这就解释了为什么 R 点转换的正常调节，具体体现在 pRb 的磷酸化，可能在大多数的癌细胞中失调（表 8.3 和表 8.4）。

表 8.3　人类细胞的分子改变导致细胞周期失调

特异性改变	临床结果
pRb 改变	
Rb 基因突变失活	视网膜母细胞癌、骨肉瘤、小细胞肺癌
Rb 基因启动子甲基化	脑肿瘤或其他
Id1、Id2 功能阻滞 pRb	各种肿瘤、神经母细胞瘤
HPV E7 病毒癌蛋白功能阻滞 pRb	黑色素瘤、宫颈癌
细胞周期素改变	
cyclin *D1* 基因扩增导致 cyclin D1 过表达	乳腺癌、白血病
上游促有丝分裂,通路引起 cyclin *D1* 基因启动子活性增强,导致 cyclin D1 过表达	各种肿瘤
GSK-3β 活性降低导致 cyclin *D1* 降低减少引起 cyclin D1 过表达	各种肿瘤
cyclin *D3* 基因活性增强引起 cyclin D3 过表达	造血系统肿瘤
cyclin 过表达	乳腺癌
hCDC4 缺失导致 cyclin E 不降解	子宫内腺癌、乳腺癌和卵巢癌
细胞周期素依赖激酶的改变	
CDK4 结构突变	黑色素癌
CDK 抑制剂改变	
15^{INK4K} 基因缺失	多种肿瘤
16^{INK4A} 基因缺失	多种肿瘤
$p^{16INK4A}$ 基因启动子甲基化	黑色素瘤、多种肿瘤
Akt/PKB 叉头样转录因子的活化导致 $p27^{Kip1}$ 基因转录下调	
Skp_2 过表达导致 $p27^{Kip1}$ 蛋白降解增多	乳腺癌、肠癌、肺癌、淋巴癌
Akt/PKB 活化对 $p27^{Kip1}$ 蛋白定位的影响	乳腺癌、食管癌、结肠癌、甲状肠癌
Akt/PKB 活化对 $p21^{Cip1}$ 蛋白定位的影响	多种肿瘤类型
Myc、N-myc 或 L-myc 酶多种序贯改变	
Id1、Id2 表达上调导致 PRb 功能阻滞	多种肿瘤类型
cyclin D2 表达上调导致 PRb 磷酸化	多种肿瘤类型
E2F1、E2F2、E2F3 表达上调导致 cyclin E 表达	多种肿瘤类型
CDK4 表达上调导致 PRb 磷酸化	多种肿瘤类型
Cul1 表达上调导致 $p27^{Kip1}$ 降解	多种肿瘤类型
$p15^{INK4B}$ 和 $p21^{Cip1}$ 表达抑制导致 PRb 磷酸化	多种肿瘤类型

表 8.4　人类肿瘤中细胞周期时钟的改变

肿瘤类型	基因产物或基因						存在一种或多种变化肿瘤的比率/%
	Rb	cyclin E1	cyclin D1	$p16^{INK4A}$	$p27^{Kip1}$	CDK4/6	
恶性胶质瘤	+	+		+	+	+/+	>80
乳腺癌	+	+	+	+	+	+/	>80
肺癌	+	+	+	+	+	+/	>90
胰腺癌			a		+		>80
肝癌	+	+	+[b]	+	+	+/[e]	>80

续表

肿瘤类型	基因产物或基因						存在一种或多种变化肿瘤的比率/%
	Rb	cyclin E1	cyclin D1	$p16^{INK4A}$	$p27^{Kip1}$	CDK4/6	
子宫内膜癌	+	+	+	+	+	+/	>80
膀胱癌	+	+	+	+	+		>70
白血病	+	+	+	+[c]	+	+/	>90
头颈	+		+	+	+	+/	>90
淋巴瘤	+	+	+[d]	+[c]	+	/+	>90
黑色素瘤		+	+	+	+	+/	>20
肝癌	+	+	+	+[c]	+	+/[e]	>90
前列腺癌	+	+	+	+	+		>70
睾丸癌/卵巢癌	+	+	+[b]	+	+	+/	>90
骨肉瘤		+		+		+/	>80
其他肿瘤		+	+	+	+	/+	>90

"+"表示这个基因或基因产物在分析的肿瘤中至少10%都有改变。基因产物的改变包括异常缺失和过表达。基因的改变包括突变和启动子甲基化。在给出的肿瘤中通常不止发生一种改变。

a cyclin D3 在一些肿瘤中上调。

b cyclin D2 在一些肿瘤中上调。

c $p15^{INK4B}$也被发现在一些肿瘤中缺失。

d cyclin D2 和 D3 在一些淋巴瘤中上调。

e CDK2 在一些肿瘤中上调。

改编自 M. Malumbres and M. Barbacid, Nat. Rev. Cancer 1:222-231, 2001.

这些机制在图 8.35 中有概述。我们已经了解很多直接机制通过 R 点，通过突变而使 *Rb* 基因失活的原理。在一些肿瘤中，通过 *Rb* 基因启动子甲基化达到相等的产量。在其他的肿瘤里，pRb 通过合成达到正常的量，可能被病毒癌蛋白灭活。例如，HPV E7 蛋白阻碍 pRb 结合和调节 E2F。

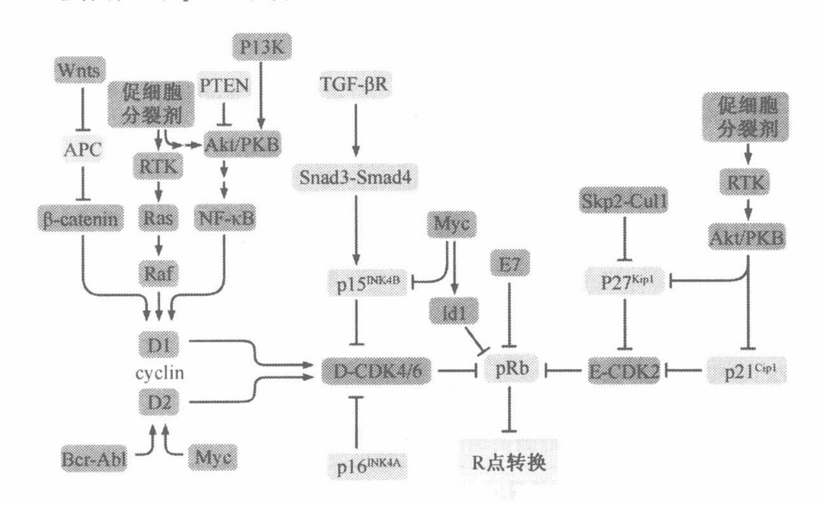


图 8.35 人类肿瘤中 R 点转换的干扰 进入 R 点转换（黄色，中间，底部）的决定在人类肿瘤中能够通过多种途径被扰乱。促进 R 点转换的元件用红色表示，阻碍这一过程的元件用蓝色表示。几乎所有的人类肿瘤都表现为促进（红色）这一过程元件的过度活化或抑制这一过程元件的失活（蓝色）。

另一种癌细胞用于使 pRb 功能失活的策略表现在很多人类肿瘤细胞中 cyclin D1 存在很高的水平。在乳腺癌细胞中，正如报道的一半肿瘤中 cyclin D1 蛋白水平升高。在这些和其他肿瘤中，通过增加 cyclin D1 基因的拷贝数过表达（如基因扩增；图 8.36）。然而，通常情况下，乳腺癌细胞主要通过控制 cyclin D1 基因表达的上游信号通路获得 cyclin D1 过表达（8.8 节）。

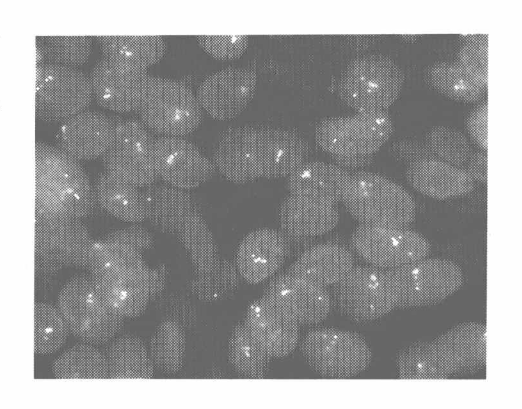


图 8.36 cyclin D1 基因的扩增 利用荧光原位杂交（FISH）能够检测组织切片中特定基因的拷贝数。图中所示的结果是利用 CCND1 探针，即人类编码 cyclin D1 的基因，来分析这个基因在头颈鳞状上皮细胞癌（HNSCC）细胞中的拷贝数。一个亮点代表这个基因的一个拷贝。细胞核被染成紫红色。因此，在此肿瘤中，CCND1 有不同程度的扩增，在每个细胞中有 3～5 个拷贝的扩增。一般来说，在 1/3 的这种肿瘤中发现有 CCND1 的扩增，导致 cyclin D1 表达的相应增加失去对 pRb 磷酸化的适当调控。类似的观察结果也能在人类乳腺癌细胞中发现（图中未示）。（From K. Freier et al.，Cancer Res. 61：1179-1182，2003.）

癌细胞通常利用很多异常的方式破坏 pRb 机制：它们关闭 $p16^{INK4A}$ 肿瘤抑制蛋白的表达。$p16^{INK4A}$ 蛋白像它的同系物 $p15^{INK4B}$，抑制 cyclin D-CDK4/6 这一主要起始 pRb 磷酸化的因子。在缺少 $p16^{INK4A}$ 蛋白的情况下，cyclin D-CDK4/6 激酶活化表达使 pRb 磷酸化在缺少制动装置下启动；pRb 磷酸化抑制解除，不适当地钝化 pRb（图 8.35）。患有家族性黑素瘤的个体表现为 $p16^{INK4A}$ 基因遗传缺陷的模型。现在还不清楚为什么缺失这个特殊的 CDK 抑制因子，它看似控制着身体中的所有细胞，也可特异地影响皮肤中的黑素细胞这一黑色素瘤细胞的正常前体。在不同类型的散发肿瘤中（如非家族性的），癌细胞经常通过另外一种方式抑制 $p16^{INK4A}$ 的功能，即甲基化 $p16^{INK4A}$ 基因启动子上存在的 CpG 序列。

已经发现在少数散发的和家族性的黑素瘤基因组中有相当多的策略控制环路的失平衡。在这些癌症里，*CDK4* 基因的点突变（R24C 突变）产生的 CDK4 分子不再对 INK4 分子（如 p15、p16、p18、p19）家族的抑制作用敏感。然而，这些不同的 CDK 抑制因子在这些肿瘤中可能完成的并且是有功能的，正常情况下对 CDK4 靶位敏感但此时却逃避。一旦 CDK4 抑制解除并且与它的 cyclin D 配体结合，以解除抑制的状态推动 pRb 磷酸化的第一步［因为 R24C 突变产生的是显性等位基因 CDK4（正常细胞水平），仅两种基因拷贝中的一种编码的 CDK 需要突变来促进癌细胞的增殖］。

参与肿瘤的发生最关键的 CDK 抑制因子可能是 $p27^{Kip1}$。正如前面提到的，$p27^{Kip1}$ 主要参与抑制 cyclin E-CDK2 复合体的活性（见图 8.15）。当细胞退出循环进入 G_0 休眠期，$p27^{Kip1}$ 水平升高（图 8.37A）。相反的，当细胞再次进入细胞周期并通过 G_1 期，在 cyclin E-CDK2 复合体的作用下 $p27^{Kip1}$ 的水平在早中 G_1 期逐渐降低并在 G_1 末期急剧降低。这种低水平不是通过降低编码 $p27^{Kip1}$ 基因转录而实现的。$p27^{Kip1}$ 水平降低是通过 Skp2 蛋白的作用，Skp2 蛋白与 Cull 和其他的一些蛋白共同作用（图 8.37B）识别 $p27^{Kip1}$ 并使之泛素化，继而被蛋白酶体降解。的确，Skp2 水平的降低解释了当细胞进入 G_0 期 $p27^{Kip1}$ 水平增加（图 8.37A 和 C）。

$p27^{Kip1}$ 和 Skp2 的负相关在不同的人类肿瘤中非常明显。因此，在乳房和口腔的癌和淋巴癌中，$p27^{Kip1}$ 和 Skp2 的水平负相关（图 8.37D），并且较高水平的 Skp2 预示患者生存率降低。此外，在人食管、乳腺、结肠直肠和肺癌中测量 $p27^{Kip1}$ 的水平，低患者

存活率与该 CDK 抑制因子低表达水平存在相关性。在所有的这些肿瘤中，Skp2 可能通过促进重要的增殖抑制剂 $p27^{Kip1}$ 的降解，而作为一种促生长的癌蛋白发挥作用。一条证明 Skp2 水平提高的线索来自于 Notch 蛋白（6.12 节），这个蛋白在很多类型的人类癌中都是过度活化的，可增加编码 Skp2 基因的转录活性。

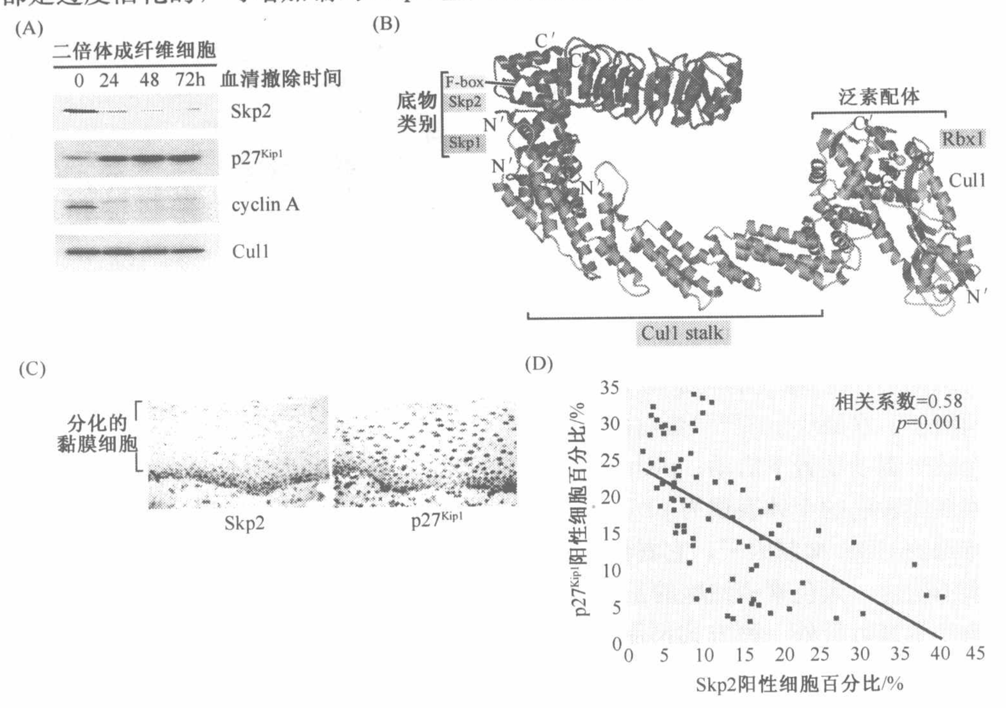


图 8.37 Skp2 抑制 $p27^{Kip1}$ 的水平 $p27^{Kip1}$ 水平受 $SCFS^{kp2}$ 复合物水平的控制，$SCFS^{kp2}$ 复合物构成 E3 泛素连接酶（信息栏 7.8）泛素化 $p27^{Kip1}$，使其被蛋白酶体降解。(A) 当正常人类细胞进入 G_0 期，休眠期，在这种情况下，因为剥夺了血清，Skp2 水平降低导致 $p27^{Kip1}$ 累积：后者，因此，抑制 CDK2 的作用，CDK2 是促进细胞通过 G_1 末期的主要因素。(B) Skp2（粉红色），主要是识别 $p27^{Kip1}$ 底物，与其他蛋白一起形成复合物。这些蛋白包括 Skpl（蓝色）、Cul1 蛋白（绿色），它们的表达被 Myc 诱导（8.9 节，图 8.28），和 Rbxl 蛋白（红色），后者结合 E2 泛素连接酶，转移部分泛素到 $p27^{Kip1}$。Cul1 主干抓住复合物的两末端维持它们 100Å 的距离，这对于底物的泛素化很重要。(C) 如图所示，在正常的口腔黏膜中，Skp2 处于低水平（左侧），则 $p27^{Kip1}$ 处于高水平（右侧）使细胞处于有丝分裂期后的状态；在很多癌症细胞中则可观察到相反的情况（图中未示）。(D) 在很多口腔上皮异常增生和癌症当中，Skp2 水平与 $p27^{Kip1}$ 的这种反向相关关系如图所描绘（相似的情况，图中未示，见于淋巴瘤和结肠直肠癌中）。(A, from T. Bashir et al., Nature 428: 190-193, 2004; B, from B. Schulman et al., Nature 408: 381-386, 2000, and N. Zheng et al., Nature 416: 703-709, 2002; C and D, from M. Gstaiger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5043-5048, 2001.)

我们多次提到 Akt/PKB 激酶过度活化状态存在于很多类型的人类肿瘤中，它由许多种分子功能障碍引起，包括生长因子受体的过度活化、PTEN 抑癌蛋白的缺失和 PI3K 的突变。同样，通过降低重要的 CDK 抑制因子的有效活性，而影响癌细胞的细胞周期（图 8.15）。通过磷酸化 $p21^{Cip1}$ 和 $p27^{Kip1}$，Akt/PKB 确保这两个重要的细胞周期

进程拮抗剂的胞质定位，使之边缘化。同时，Akt/PKB 通过磷酸化 Forkhead 家族的一个转录因子，抑制编码 $p27^{Kip1}$ 基因的表达，从而进一步降低细胞中整体的 $p27^{Kip1}$ 浓度。

在 8.9 节中，我们提到正常细胞中的 Myc 蛋白通过多种途径将其功能延伸至细胞周期时钟，并影响很多关键的调控元件。而 Myc 癌蛋白的作用在本质上与之相类似。二者之间的差别主要或可能完全是蛋白质水平所致：在正常细胞中，Myc 蛋白水平高度依赖于细胞外的促有丝分裂生长因子。然而，在很多癌细胞中，Myc 蛋白的组成性生成不依赖进入细胞的有丝分裂信号。

鉴于这一观点，我们可以得出，很多 Myc 蛋白的干扰作用在许多携带 *myc* 癌基因或者其致癌同系物，N-*myc* 和 L-*myc* 的人类肿瘤细胞中被放大。在被 Myc 诱导的产物中，Id 蛋白具有最为重要的生理学作用。一方面，它们作为显性负性抑制 bHLH 转录因子抑制剂；另一方面，它们能够结合 pRb，可能通过病毒癌蛋白，如 T、E7 和 E1A，抑制 pRb 作用。

事实上，异位表达 Id1 蛋白能够取代 pRb 对 SV40 大 T 抗原的结合，从而逆转休眠期的细胞。这种特殊的 Id 蛋白在很多种肿瘤中过表达，包括子宫内膜、头颈部、乳腺、胰腺、食管、宫颈癌、黑色素瘤和神经母细胞瘤。对于很多这些类型的肿瘤，Id 蛋白的表达水平与肿瘤的恶性程度和侵袭力呈正相关性。

如图 8.35 中所示，不同的遗传和生化策略都集中到一点，即 pRb 功能失控，由此破坏正常 R 点转换的紧密调控。发生在微观活组织中的达尔文选择，利于那些恶性生长细胞的向外生长，这些细胞成功地灭活关键的 pRb 终止机制，并由此对 R 点转换失控。

8.13 总结与展望

所有的生理信号和影响细胞增殖的信号通路，或早或晚地以某种方式与细胞周期时钟调控相联系。它代表细胞的大脑——中枢信号处理器接收不同来源的传入信号，整合这些信号，最终做出关于生长还是休眠的判断，在后一种情况下，是否退出活性细胞周期是可逆的。与后面的决定相联系的是控制细胞进入组织特异分化阶段的调控机制。

细胞周期的核心元件已经清楚地呈现在真核生物的单细胞中，包括很多对 baker 酵母、酿酒酵母的研究。与多细胞生物体的复杂组织相比，单细胞有机体与更小范围的外部信号发生反应。这些简单的有机体缺少很多存在于脊椎动物表面的不同类型的生长因子受体和其他受体，如整联蛋白，一种人类细胞用来感觉和控制与细胞外基质的联系的蛋白。酵母细胞同样缺乏生长抑制受体，如 TGF-β 受体，它在整个人类组织中发挥关键性的作用。

所有这些解释了为什么调控动物细胞核心周期机制的外周组件，被加入地球上的历史年代相对较近的生命——大约 6 亿万年前，当多细胞动物第一次出现。对各种输入信号的应答的需要，解释了为什么核心机制加入了如此之多的不同层面的调控作用。没有这些外加的调节器，特别是 CDK 抑制剂，核心机制将不能对传入的各种信号迅速做出反应，如损伤多细胞动物信号或调节其增殖信号。

然而细胞外部和细胞周期的这些联系是假想的，其他关键调节器也被整合进这个复

杂的通路。事实上，pRb 及其同系物 p107 和 p130 是控制 G_1 期进程的主要调节器，似乎产生于多细胞生物出现之前：pRb-E2F 信号通路参与细胞周期调控在 *Chlamydomonas reinhardtii* 中就已经出现，*Chlamydomonas reinhardtii* 是一种单细胞藻类与陆生植物的祖先有关。类似地，构成 pRb-和 E2F-样蛋白存在于蠕虫和苍蝇中，提示它们存在于早期的多细胞生物中。

在进化过程中 pRb 在这三种袋蛋白可能不是最早出现的，但是在哺乳动物优先选择过程中，它获得了主要控制通过 R 点的优势。这三种蛋白控制着细胞不同生长一休眠状态的各个方面，并且在这个意义上讲这三种蛋白处于细胞周期的上游。同时，通过影响基因的转录，这些蛋白产生了细胞周期和活化了的下游回路的联系，使细胞完成复杂的生化改变来确保细胞进入 S 期。

一些新生瘤的生长状态可以通过细胞周期的运转作用来进行解释。我们可以解释癌细胞解除增殖管制失控，是以通过 pRb 的作用和控制其磷酸化状态的分子状态的方式进行。没有 pRb 的控制，对癌蛋白如 Ras 的生长促进作用的需求显著降低，并且细胞不需要完成正常情况下细胞通过 R 点的先决条件，便可通过 G_1 期。关于癌蛋白的生长促进作用需要量极大地降低，并且细胞通过 G_1 期不需要达到正常细胞决定是否通过 R 点的前提条件。增殖和阻滞分化的偶联，我们仍然不完全了解，似乎可以追溯到一些蛋白的作用，如 Myc，可能起源于蛋白操控如 Myc，它推动细胞通过 G_1 期的同时拮抗一些主要的分化调节器。

令人惊讶地，一个重要的细胞增殖调控不依赖于细胞周期。正如我们将在第 10 章讲到的，正常细胞在失去进一步增殖的能力之前，只能进行有限次数的复制；癌细胞则有无限增殖的能力，即无限增殖的表型。细胞内计算复制代数的分子装置存在于细胞系的染色体 DNA 中，这些装置似乎不受调节细胞周期进程的 cyclin-CDK 复合体的控制。

然而其他恶性瘤生长过程不受细胞周期的控制。细胞反应很强烈，本质上不能通过激活细胞自杀程序——凋亡来修补基因组的损伤；这种反应似乎不能与细胞周期机制直接联系。这一过程我们将在下一节进行讲述。

癌细胞其他很多的表型与胞质内的癌蛋白（如 Ras）有关。包括细胞的活动性、细胞形态的改变、非依赖性锚定、新陈代谢的改变和侵袭力。这些行为同样不受细胞周期的控制，它在细胞核内起作用。

虽然癌细胞中细胞周期呈现严重的失控，但是事实上我们发现这些细胞只是细胞周期机制中一个小部分失常，尤其是，这些元件控制着细胞周期通过 G_1 期。我们可以这样来了解这一过程，即通过发生在 G_1 期后 R 点的转换这个决定细胞命运的关键点；如果癌细胞要获得具有增殖优势趋势，这一决定点就必须解除管制限制。然而，一旦细胞经过 R 点并到达 G_1/S 过渡期，细胞周期进程本质上保持基本上是自动的，按照预定的程序完成预编程序的形式。相应的，癌细胞的 S、G_2 和 M 期，同样表现出极其复杂的生物化学的和细胞生物学的方式，接近类似的正常细胞的细胞周期进程。这有助于解释癌细胞经常出现的方式：它们的生长和分化周期不一定比体内的正常细胞短。相反，癌细胞持续进入细胞周期，这些循环在正常细胞增殖被阻滞的情况下持续增殖（见图 7.32）。

除了 G_1 期进程的关键性调节器，其他可能影响恶性肿瘤生长的细胞周期的元件是

一些蛋白，作为控制 S 和 M 期的检测点，特别是那些作用于 G_1/S 期转换、S 期和 M 期。在某些癌中，它们的失活不是直接使靶细胞增殖失控。这些检测点的失活作为细胞基因组不稳定的因素，使得初期的癌细胞产生相对于正常人类基因组广泛的序列改变。这些细胞和它们的后代产生异常的遗传结构，其结果更利于肿瘤的生长。我们将在第 12 章介绍基因组的不稳定性。

在此方面仍存在巨大的空白需要我们去填补。我们现在仍然不是很了解为什么 pRb 的失活对于癌细胞的产生如此重要，然而它的两个同系物 p107 和 p130 的失活在肿瘤发生中的作用即使存在也是微乎其微的。我们也不了解身体大多数类型细胞怎样决定增殖与分化的。与之相关的观察表明 pRb 可以与除了广泛研究的 E2F 之外的很多其他的转录因子相互作用。其中一些转录因子可能控制促进一定分化过程基因的表达。我们也还不知道究竟有多少癌蛋白作为转录因子（表 8.2）扰乱细胞周期进程。此外，当前很多关于细胞周期调控的预见，如在本章所描述的，可能在未来的某一天得到符合实际的修改（信息栏 8.8）。

信息栏 8.8　我们对于细胞周期的了解比预期中的要少　我们在新世纪最初几年内对遗传改变小鼠的研究表明，对细胞周期装置的研究正如在这章所提到的，还需要重新修定。例如，突变小鼠的胚胎缺失三种 D 型周期蛋白基因中的两种拷贝（如具有 $D1^{-/-}$ $D2^{-/-}$ $D3^{-/-}$ 基因型），但是多数能够通过胚胎发展阶段，一些死于胚胎的第 16 天。这一章的讨论里没有提供任何关于解释这些胚胎细胞在缺失 D 型周期蛋白，这种推动细胞通过 G_1 期的周期蛋白的情况下如何通过很多的生长路线和阶段的线索。同样的，小鼠胚胎缺失两种 *cyclin E* 基因（如具有 $E1^{-/-}$ $E2^{-/-}$ 基因型）时，能够在发育到妊娠中期时死于胎盘缺陷；如果能避免这种情况胚胎就会发育到足月时才死亡。再者，已存在的模型没能解释细胞是如何完成 G_1 期的最后阶段并开始进入 S 期。这些令人吃惊的结果提示可能存在一个正常的潜在细胞周期调控，它遗传自我们的原生动物祖先，并能在现代多细胞动物细胞周期机制失灵时出现并代之发挥作用。

我们探讨了细胞周期调控的细节和发生在各种不同类型癌细胞中不同的干扰方式，这些基本的改变是我们进一步了解临床疾病所必需的：这些变化在实际中如何影响肿瘤的发生和患者的出现？事实上，pRb 功能缺失可以显著影响癌细胞的行为。例如，图 8.38 中所示，乳腺癌患者的癌细胞中 cyclin E 异常高表达预示着恶性侵袭和较差的预后，而它的低水平则预示着长期的无瘤生存率。在这种情况下，cyclin E mRNA 的表达可能升高，其正常用于降低 cyclin E 的机制可能丧失。其结果是过高的 cyclin E 水平促进 pRb 磷酸化和失活的抑制解除。这些观察提供了令人注目的效果，即细胞周期在其标准状态是肿瘤发生的主要抑制剂，当它被不同的损伤扰乱，就成为癌发生的因素。

我们讨论的 pRb 和细胞周期调控提示这个蛋白在所有肿瘤抑制基因产物中的重要性。事实上，pRb 和另一个蛋白 p53 共享这一地位，p53 同样在正常细胞生理学和癌发生中发挥重要作用。就其本质来说，pRb 通路是处理细胞与外界环境的关系。p53 通路则具有不同的作用，只有当细胞内的所有重要的调控系统发挥正确的功能时，它才对细胞内环境的正常性进行监控并允许细胞增殖和细胞存活。正如我们将在下一章提到的，p53 信号通路的失活对于癌细胞的发展与 pRb 的调控和 R 点的转换同样重要。

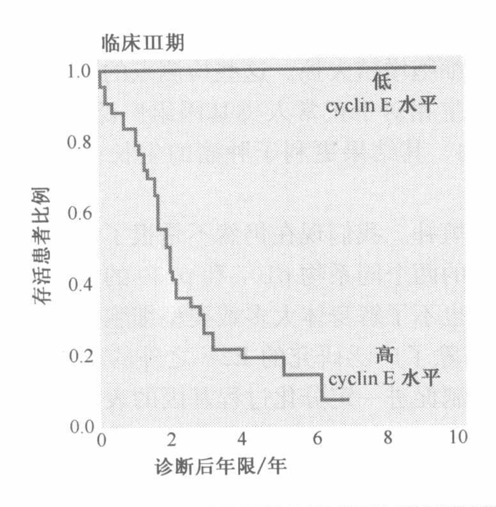


图 8.38 cyclin E 和乳腺癌发展 这一 Kaplan-Meier 曲线出现在临床Ⅲ期的乳腺癌，即那些肿瘤较大且有局部淋巴结转移，但没有明显的远端转移灶。标绘的是在初次诊断后数年内（横坐标）仍然存活的患者比例（纵坐标）。（From K. Keyomarsi et al.，N. Engl. J. Med. 347：1566-1575，2002.）

重要概念

- 细胞周期是由一连串事件组成的精确过程，能够使一个细胞复制从而产生两个子细胞。这一连串事件通过被称为细胞周期的机制所调控。
- 构成细胞周期调控的机制似乎在人体所有类型的细胞中都是相似的。
- 细胞周期利用一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶——周期依赖激酶（CDK），来完成细胞周期的不同阶段。
- 细胞周期的特定进程通过改变周期蛋白的水平和效力来控制，周期蛋白发挥作用是通过活化它们的起催化作用的 CDK 伴侣。
- D 型周期蛋白传送细胞外的有丝分裂信号到细胞周期核心机制，而剩余的周期蛋白按照预定的程序调控，一经细胞发出指令就通过 G_1 期。
- 而 D 型周期蛋白的水平主要靠细胞外的信号调控，它们的迅速降解（通过泛素化途径）使得其他周期蛋白逐渐积累从而确保细胞周期只向一个方向发展。
- 检测点的调控遍布细胞周期以确保细胞周期中前一个步骤的完全结束再进入下一步。很多类型的癌细胞有一个或多个检测点的失活，辅助它们积累突变基因和核型改变从而促使新生瘤生长。
- 决定细胞增长或休眠发生在 G_1 期。对于正常细胞，决定生长和增殖需要来自外界环境的信号（因此依赖于 D 型周期蛋白在有丝分裂信号上的水平）。其后，进入细胞周期的其他阶段相对不依赖外界信号。
- 限制点（R 点）表示细胞自我调节的一点，本质上不能取消，用于完成剩下的细胞周期或者停留在 G_1 期也可能从有效的细胞周期中退出而进入 G_0 期休眠状态。决定 R 点机制的失常伴随着很多类型的癌细胞形成，因为它能导致细胞的无限增殖。
- 决定细胞生长还是休眠通过 pRb 的磷酸化状态控制。周期蛋白 D 和 E 控制着 pRb 磷酸化程度。pRb 低磷酸化阻碍通过 R 点，而 pRb 高磷酸化则促进这一过程。
- pRb 控制通过 R 点是利用结合或释放结合在基因启动子上的转录因子 E2F，引导细胞从 G_1 期进入 S 期。低磷酸化 pRb 结合 E2F，而高磷酸化 pRb 释放 E2F。当存在

病毒癌蛋白时，它们模拟 pRb 高磷酸化阻止 pRb 结合 E2F。

- 在癌细胞中，许多可选择的机制确保细胞增殖而不被 pRb 束缚。这些作用很多是引起 pRb 高磷酸化从而引起其功能失活。依次，这种允许使这些细胞增殖失控。
- pRb 作用能通过不同种方式丢失，包括过度促有丝分裂信号（因为它们提高周期蛋白 D 的水平，进而通过磷酸化使 pRb 失活）；Rb 基因突变；病毒癌蛋白结合 pRb（如 HPV ET）；和细胞癌蛋白的作用（如 Myc）促进 pRb 磷酸化或直接影响 pRb 的活性。
- 细胞分化的控制与细胞周期进程的调节是配对的。pRb 低磷酸化阻滞细胞增殖促进它们的分化。相反，其他调节蛋白，如 Myc 和 Ids 的作用是抑制细胞分化。
- 大多数类型的癌，分化被局部或全部阻滞。一般来说，高度分化细胞构成的肿瘤它的侵袭性越弱。

思考问题

1. 为什么在人类肿瘤中通过突变编码 pRb 的基因使 pRb 功能缺乏而编码它的两个同系物的基因 p107 和 p130 在癌细胞的基因中几乎不发生突变？
2. 为什么 DNA 肿瘤病毒具有使 pRb 功能失活的作用？
3. CDK 抑制因子的缺失是如何影响细胞周期的进程？
4. 什么样的分子机制保障一旦通过检测点，这个导致不可逆的指令完成剩余的细胞周期而进入 M 期？
5. 如何决定细胞生长与休眠的配对机制来引导细胞分化？为什么这两种进程必须紧密地配对？
6. 细胞是如何保障具有转录活化作用的 E2F 转录因子在细胞周期中只限于狭窄的时间窗内？如果 E2F 的作用在细胞周期中延续将会发生什么？
7. Myc 癌蛋白以何种途径解除细胞增殖和分化的管制？
8. 为什么细胞周期从不倒退很重要？什么机制保证这一事件从不发生？

参考读物

Bashir T & Pagano M (2003) Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis. *Adv. Cancer Res.* 65, 101–144.

Blagosklonny MV & Pardee AB (2001) The restriction point of the cell cycle. In Cell cycle checkpoints and cancer (MV Blagosklonny ed), pp 52–64. Georgetown, TX: Landes Bioscience.

Blais A & Dynlacht BD (2004) Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 527–532.

Bloom J & Pagano M (2003) Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41–47.

Classon M & Dyson N (2001) p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* 264, 135–147.

Classon M & Harlow E (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 910–917.

DeSalle LM and Pagano M (2001) Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.* 490, 179–189.

Dyson N (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245–2262.

Eisenman RN (2001) Deconstructing Myc. *Genes Dev.* 15, 2023–2030.

Harbour JW & Dean DC (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2293–2409.

Hasskarl J & Münger K (2002) Id proteins—tumor markers or oncogenes? *Cancer Biol. Ther.* 1, 91–96.

Hunter T & Pines J (1994) Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573–582.

Levens D (2002) Disentangling the MYC web. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5757–5759.

Liu H et al. (2004) New roles for the RB tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 55–64.

Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059–1064.

Lutz W, Leon J & Eilers M (2002) Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta Revs. Cancer* 1602, 61–71.

Malumbres M & Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 222–231.

Marcu KB, Bossone SA & Patel AJ (1992) *myc* function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 809–860.

Massagué J (2000) How cells read TGF-β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.

Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298–307.

Massari ME & Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* 20, 429–440.

Mulligan G & Jacks T (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet.* 14, 223–229.

Nevins JR (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424–429.

Nevins JR (2001) The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10, 699–703.

Perk J, Iavarone A & Benezra R (2005) Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5,603–614.

Reed S (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 855–864.

Reiss M (1999) TGF-β and cancer. *Microbes Infect.* 1, 1327–1347.

Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.

Sherr CJ (1998) Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 12, 2984–2991.

Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 731–737.

Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.

Sherr CJ & Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.

Siegel PM & Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.

Slingerland J & Pagano M (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell Physiol.* 183, 10–17.

Tapon N, Moberg KH & Hariharan IK (2001) The coupling of cell growth to the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 731–737.

Trimarchi JM & Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11–20.

Yamasaki L & Pagano M (2004) Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 623–628.

（詹启敏　宋咏梅　晏　杰　贾立立）

第 9 章　p53 与凋亡：守护神兼刽子手

为了探寻生命的起因，我们必须溯求于死亡。

Mary Shelley，Frankenstein，1831 年

毫无疑问，高等生物自身的构成中就蕴含着死亡。

August Weissmann，philosopher of biology，1889 年

多细胞动物都能从自身组织中清除有缺陷或者失活的细胞。基于这个功能，哺乳动物在它们的细胞内拥有一个忠实的警卫。几乎在所有的哺乳动物细胞中，p53 蛋白都承担着这项重要的功能，保证细胞机能有条不紊。

假如 p53 接收到细胞代谢紊乱或者遗传损伤的信息，它将阻止细胞生长分裂循环的进程，并且同时促进细胞损伤的修复。如果 p53 认为代谢紊乱或者基因组的损伤无法修复，则释放信号激活细胞潜在的自杀程序——**凋亡**。这将导致该细胞的迅速死亡，因为如果不清除这样的细胞而任由它继续生长将对机体的健康和发育造成威胁。

凋亡程序控制个体中大多数细胞，其中有些凋亡可能是由激活 p53 引起的。细胞凋亡过程包括一系列显著的细胞学改变，这些改变保证了细胞的消亡，通常在 1h 内凋亡开始被激活。随后出现潜在而有效的凋亡机器，它对初期的肿瘤细胞形成威胁，因为它专门清除那些将要成为瘤的细胞。这解释了为什么在组织中恶化前细胞获得稳定立足点之前，p53 必须失活。如果不弄清楚 p53 的功能与凋亡的关系，我们就无法了解导致各种人类肿瘤发生过程的本质。

9.1　多乳头瘤病毒导致 p53 的发现

当将被 SV40 DNA 肿瘤病毒转化的小鼠细胞注射到遗传背景清楚的小鼠体内（如同源宿主）时，宿主的免疫系统反应强烈，针对只在被病毒转化细胞中存在而正常小鼠细胞中没有的核蛋白产生抗体（图 9.1）。这种蛋白质叫做大 T（large T，LT）抗原，由病毒基因组的一段区域编码，当该病毒感染猴肾细胞并复制时也会表达同样的蛋白质，作为宿主的猴肾细胞允许整个感染（裂解，lytic）周期的完成（见 3.4 节）。

大 T 是 SV40 病毒产生的具有多种功能的一种蛋白，用来扰乱被感染或者转化细胞的调控。实际上，大 T 在前一章中已经提到，它能与 pRb 结合并且使其功能失活（信息栏 8.4）。抗大 T 血清从携带 SV40 诱导的小鼠或者仓鼠中获得，早在 1979 年就被用来鉴定在 SV40 转化细胞中是否有该蛋白的存在。这个免疫沉淀物中除了大 T，还有一个与其相互作用的蛋白，分子质量为 53～54kDa（图 9.2）。p53 蛋白的抗血清能在小鼠胚胎肿瘤细胞中检测到，随后也在许多从未感染过 SV40 的人类和啮齿类肿瘤细胞中检测到。但是，单克隆抗体只能识别被病毒感染的细胞中与大 T 免疫沉淀的 53～54kDa 的蛋白，而在未被感染的细胞中则不能识别。

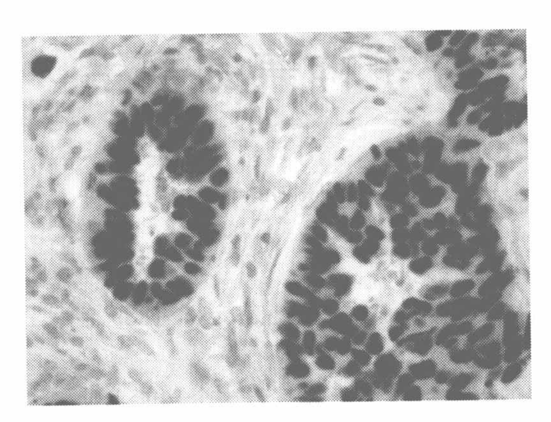


图 9.1　SV40 转化细胞系中大 T 抗原　与 SV40 大 T 抗原（LT）结合的抗体可以被用来检测 SV40 转化的肿瘤细胞核内的 LT。在此图中，这个抗体用来对 SV40 和其他两个基因转化人类乳腺上皮细胞（MEC）染色。对由 SV40 转化的小鼠细胞染色也可以得到类似的图像。通过将抗体与过氧化物酶偶联来检测 LT，产生暗棕色的斑点。此图中，在肿瘤组织中，被转化的 MEC 细胞形成管状（见横切面），它的周围则是正常的间质细胞（浅蓝色细胞核）。（Courtesy of T. A. Ince.）

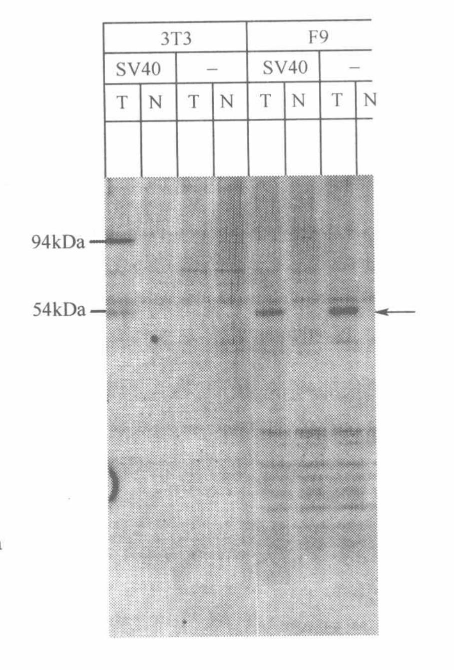


图 9.2　p53 的发现　普通的 BALB/c 3T3 小鼠成纤维细胞（3T3），F9 胚胎肿瘤细胞（EC）被 SV40 转化后，用^{35}S-甲硫氨酸处理，产生的裂解液和普通的仓鼠血清（N）或者被 SV40 转化的仓鼠细胞免疫产生的仓鼠抗血清（T）孵育。病毒感染的 3T3 细胞可以与抗肿瘤血清免疫共沉淀一个大约 94kDa 的蛋白，而未感染的 3T3 细胞则不能。另外，另一种在 54kDa 附近的蛋白质也同样只能在病毒感染的 3T3 细胞中检测到。同时，这种蛋白质也能在 F9 细胞中被免疫共沉淀，无论是否被 SV40 细胞感染。这个数据并没有直接证明 SV40 大 T 蛋白（94kDa 蛋白质）与 p53 蛋白有物理作用，但是证明了 p53 在两种不同的转化细胞中表达都有提高。（From D. I. Linzer and A. J. Levine，Cell 17：43-52，1979.）

综上所述，这些发现揭示了在 SV40 转化的细胞中表达的大 T 蛋白能和一种新发现的蛋白质结合，这种蛋白质被命名为 p53。能同时与大 T 以及 p53 反应的血清可能用于在一些未被感染的细胞中检测 p53，这些肿瘤细胞是被非病毒机制转化的，如图 9.2 中分析的 F9 胚胎肿瘤（EC）细胞。随后的研究证实，p53 是来源于细胞而不是病毒。在同一年，有报道肯定了这一结论，化学致癌剂转化的小鼠细胞同样表达 p53。

繁多的证据显示了大 T 癌蛋白的功能，至少一部分功能是锚定结合宿主细胞蛋白（大 T 抗原也能与 pRb 结合，即 7 年之后被发现的视网膜母细胞瘤蛋白）。自从 1979 年发现 p53 后，在接下来的若干年中，又发现了许多其他的 DNA 病毒以及至少一种的 RNA 病毒能够使癌蛋白与 p53 结合或者使其失活（表 9.1）（我们将在这一章的后面部分讨论，这个表格中的病毒也能与 pRb 结合，并阻止凋亡）。

表 9.1　扰乱 pRb、p53 凋亡功能的肿瘤病毒

病毒	病毒蛋白阻断 pRb	病毒蛋白阻断 p53	病毒蛋白阻断凋亡
SV40	large T（LT）	large T（LT）	
Adenovirus	E1A	E1B55K	E1B19K[a]
HPV	E7	E6	
Polyomavirus	large T	large T?	middle T（MT）[b]
Herpesyirus saimiri	V cyclin[c]		v-Bcl-2[d]
HHV-8（KSHV）	K cyclin[c]	LANA-2	v-Bcl-2[d]，v-FLIP[e]
HCMV	IE72[f]	IE86	vICA[g]，pUL37[h]
HTLV-1	Tax[i]		
Epstein-Barr		EBNA-1[j]	LMP1[j]

a 类似 Bcl-2 起到阻断凋亡的作用。

b 激活 PI3K 随后激活 Akt/PKB。

c 与 D 型 cyclin 相关。

d 与细胞 Bcl-2 抗凋亡蛋白有关。

e 病毒 caspase-8（FLICE）抑制蛋白：阻断细胞凋亡级联的早期阶段。

f 与 p107 和 p130 作用并抑制其功能，可能同样靶作用于 pRb，将其在蛋白酶体中降解。

g 与 caspase-8 结合并抑制其功能。

h 抑制 caspase-8 之后，细胞色素 c 释放前的凋亡途径。

i 诱导 cyclin D2 的合成，并与 16^{INK4A}结合并使其失活。

j LMP1 促进 p52 NF-κB 的激活并由此诱导 Bcl-2 的表达；EBNA-1 通过细胞蛋白 USP7/HAUSP 起作用，降低 p53 的水平。

9.2　p53 被发现为肿瘤抑制基因

将 *p53* cDNA 克隆转染大鼠胚胎成纤维细胞（REF），揭示了它可以和共转染的 *ras* 癌基因共同转化这些啮齿类动物的细胞。这说明 *p53* 基因可能与 *myc* 类似起着癌基因的作用（有时在小鼠中为 *Trp53*，人类中为 *TP53*），因为在之前的研究中也发现 *myc* 可以与癌基因 *ras* 一起使啮齿类动物的细胞转化（见 11.10 节）。和 *myc* 一样，导入的 *p53* cDNA 可以在癌基因 *ras* 同时表达的情况下，使细胞的生长信号改变从而导致细胞的转化。

但事实并非如此。后来的研究发现，此 *p53* cDNA 以来自肿瘤细胞的 mRNA 为模板合成，而从正常细胞中获得的 *p53* cDNA 则不能使细胞转化，甚至抑制了细胞的转化（图 9.3）。比较两种 cDNA 的序列后，发现有一个碱基发生了改变，这个点突变导致了 p53 蛋白中一个氨基酸的改变。因此，最早运用克隆产生的是一个突变的 p53 蛋白，其功能发生了改变。

这些结果显示野生型的 *p53* 等位基因实际功能是抑制细胞的增殖，当可读框发生点突变，p53 蛋白就会获得促进细胞生长的功能。鉴于这些发现，*p53* 基因最终被认为是一个肿瘤抑制基因。

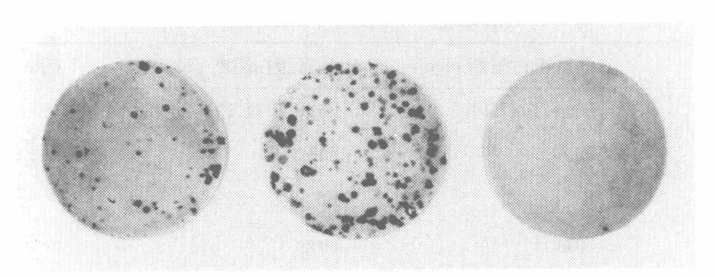


图 9.3 p53 在细胞转化中的功能 将一个编码 ras 癌蛋白的 cDNA 与 7 种不同形式的 *p53* cDNA 共转染到大鼠胚胎成纤维细胞中。在 *p53* 缺失突变载体中，几乎缺失了全部的 *p53* 可读框（左），只形成了很少的聚集点。在 *p53* 点突变的情况下（中间），一大片聚集点形成。而在 *p53* 野生型的克隆中（右），没有聚集点的形成。（From D. Eliyahu et al.，Nature 312：646-649，1984.）

直至 1987 年，研究发现 *p53* 的等位基因点突变在很多人类肿瘤细胞的基因组中广泛存在。至 2002 年，累积的数据显示，在 30％～50％的人类肿瘤中都存在 *p53* 基因的突变（图 9.4）。实际上，在迄今所有人类肿瘤细胞基因组中，*p53* 是发生突变频率最高的，在大约一半的人类肿瘤中都以突变的形式存在。

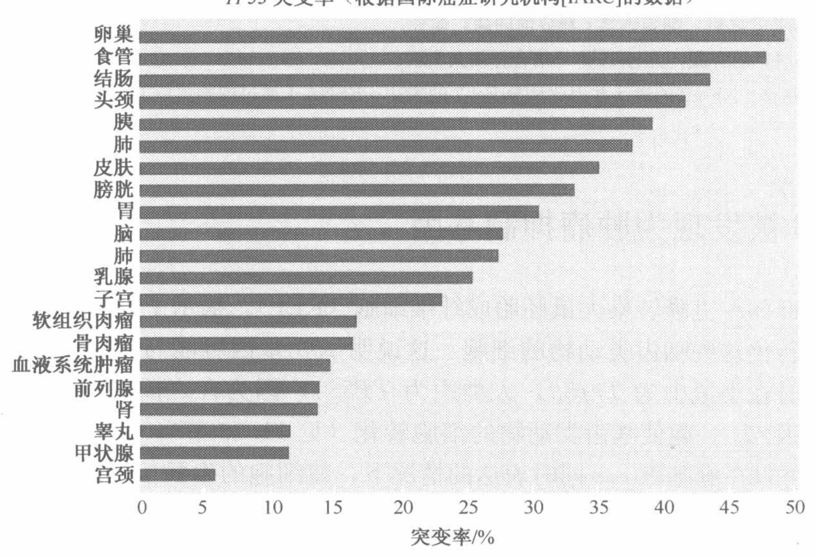


图 9.4 *p53* 等位基因在人类肿瘤细胞中突变的频率 如此图中所示，*p53* 等位基因在高发的人类肿瘤中的突变频率是很高的。这些截至 2002 年 6 月的数据，包括了 *p53* 在 17 689 个体细胞和 225 个生殖细胞中的突变。这些横条表示了各种肿瘤中 *p53* 等位基因突变的百分比。（From International Agency for Research on Cancer，TP53 genetic variations in human cancer，IARC release R7，2002.）

随后对于 *p53* 功能的进一步分析显示，*p53* 并不是一种典型的肿瘤抑制基因。以大

多数肿瘤抑制基因为例，当小鼠种系中（通过运用 7.10 节中所描述的使靶基因失活的方法）这些基因纯合子失活时（如“敲除”），几乎无一例外的由于一个或多个组织的形态发生出错而导致胚胎发育中断。这些肿瘤抑制基因似乎是多种类型细胞增殖的负调控，它们在细胞调控通路中的缺失将导致一些细胞的不正常增殖从而中断正常发育。

完全相反的是，小鼠种系中两个 *p53* 拷贝基因的完全缺失对于绝大多数的 $p53^{-/-}$ 胚胎的发育并无明显的影响。因此，*p53* 不能被简单地认为是正常发育中细胞增殖的普通负调节者。当然，*p53* 仍是一个确定的肿瘤抑制基因，因为当小鼠种系中两个 *p53* 基因拷贝都缺失的时候，小鼠生命周期会变短（约 5 个月），大多数死于淋巴瘤和肉瘤（图 9.5）。这个特点第一次提示了 p53 蛋白并不是操纵增殖或者非增殖信号从而持续影响细胞调控。实际上，p53 似乎是专门阻止非正常细胞的出现，尤其是那些有可能导致肿瘤的细胞。

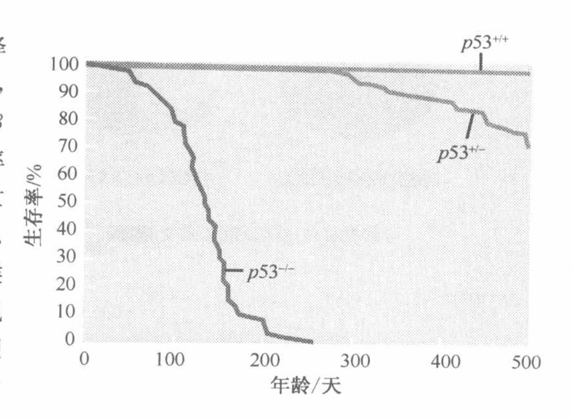


图 9.5　小鼠种系中突变 *p53* 等位基因的影响
此 Kaplan-Meier 曲线（生存率曲线制法之一，译者注）中，纵坐标表示小鼠类型生存的百分比，横坐标表示以天为单位的生存时间。在缺失 *p53* 功能的 $p53^{-/-}$ 小鼠中，胚胎发育以及出生成活率基本没有受到影响，但是在生命的相对早期死亡率相当高，大部分死于肿瘤，如肉瘤和白血病。所有的 $p53^{-/-}$ 纯合子小鼠都在大约 250 天的时候死于恶性肿瘤（红色线条），$p53^{+/-}$ 杂合子小鼠（蓝色线条）也在这个时期发生肿瘤，而野生型（$p53^{+/+}$）小鼠（绿色线条）则在几乎 500 天中都没有出现死亡。（Adapted from T. Jacks et al., Curt. Biol. 4：1-7，1994.）

9.3　突变的 p53 影响正常 p53 的功能

p53 基因在肿瘤细胞基因组中的变化频率显示许多初期的肿瘤细胞都必须干扰或者破坏 p53 的功能才能旺盛生长。这些观点提出了一个疑问，这些细胞是如何使 p53 蛋白失活的？另外还有一个疑点，*p53* 基因似乎并没有遵循 Knudson 关于肿瘤抑制基因丢失的双击理论。例如，有研究发现编码突变 p53 蛋白的 cDNA 克隆能直接转化野生型大鼠胚胎成纤维细胞，与 Knudson 关于肿瘤抑制基因作用的模型相矛盾（7.3 节）。

依照 Knudson 理论，恶化前的细胞只有同时失去了控制其增殖的肿瘤抑制基因两个拷贝才能获得实质上的变化。按照 Knudson 模型，这些基因的失活是由于隐性等位基因的突变造成。因此，在只有一个拷贝的肿瘤抑制基因失活的情况下，由于基因仍有减半的功能，恶化前的细胞获益很少，或者根本不会获益，剩下的野生基因拷贝足够行使其正常功能。如第 7 章中所介绍，只有肿瘤抑制基因在两次连续的失活突变中被去除，或者通过一个失活突变与杂合子丢失同时发生，才能出现细胞表型上的实质变化（见 7.4 节）。

Knudson 模型很难解释将突变的 *p53* cDNA 导入大鼠胚胎成纤维细胞中所发现的

结果。很明显，突变的 *p53* cDNA 能够改变细胞的表型，虽然这些胚胎成纤维细胞中仍然有它们自身的一对野生型 *p53* 基因拷贝。这意味着，这些导入的突变 *p53* cDNA 并不是仅仅作为隐性等位基因而失活，而似乎当点突变的 *p53* 等位基因导入这些大鼠胚胎成纤维细胞时，可以主动地发挥某些显性功能。

另一条线索来源于对于多种肿瘤细胞基因组中突变 *p53* 等位基因的序列分析。这些分析说明绝大多数与肿瘤相关的突变 *p53* 等位基因都在它们的可读框区存在**错义**密码子（导致氨基酸的改变），而不是**无义**密码子（导致多肽链过早的终止）。迄今为止，大约超过15 000 个来自人类肿瘤细胞基因组中的 *p53* 等位基因被测序，发现其中大约75%都存在错义突变（图 9.6）。另外，*p53* 基因可读框中的序列缺失相对来说较少见。研究者由此得出一个不容忽视的结论：肿瘤细胞在 p53 蛋白发生轻微改变的情况下比它完全缺失更获益，如通过无义突变或者直接删除 *p53* 基因的重要部分而形成**无效等位基因**。

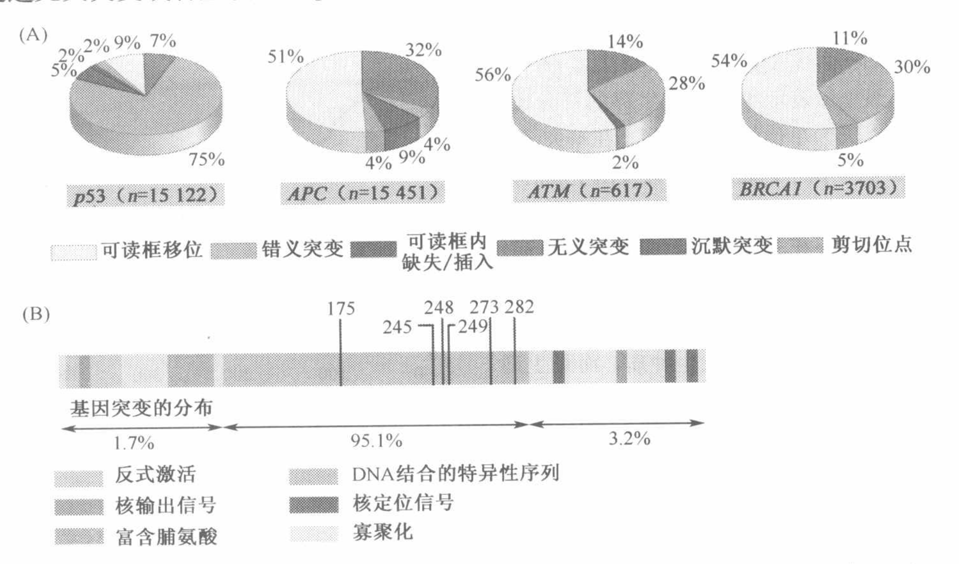


图 9.6　*p53* 突变的本质　(A) 如此图所示，点突变的 *p53* 等位基因（几乎都导致了氨基酸的改变，绿色）代表在人类肿瘤中发现的绝大多数的 *p53* 突变等位基因类型，而其他类型的突变则相对较少。相反，其他肿瘤抑制基因（*APC*）或者参与基因组稳定性的“看管”基因（*ATM*、*BRCA1*）中的突变多为可读框移位（黄色）或者无义密码子（蓝色），它们都能改变蛋白的结构，通常都是产生一个截短了的蛋白质，这些有缺陷的蛋白质在细胞中通常很快就被降解。(B) 人类肿瘤中超过 15 000 个 *p53* 的突变等位基因已经被测序，大多数是点突变。这些点突变在可读框中的位置在图中被标出。非常明显，大多数的 *p53* 突变（95.1%）都影响着 p53 蛋白的 DNA 结合结构域。图上方的数字表示氨基酸残基的序列。（A，from A. I. Robles et al.，Oncogene 21：6898-6907，2002；B，from K. H. Vousden and X. Lu，Nat. Rev. Cancer 2：594-604，2002.）

解决突变的 p53 蛋白如何促进肿瘤细胞形成这个难题主要通过两个方面。一是对于酵母遗传学方面的研究表明，有意义的突变使编码的基因产物失活可以发现某个突变的等位基因。同时，这个突变使得突变等位基因能够干扰或者妨碍细胞中那个剩下的野生型拷贝的正常活性。这种类型的等位基因被命名为差异显性干扰或者显性负等位基因。

另外的线索来自于对 p53 蛋白的生物化学分析，分析揭示 p53 是一个核蛋白，一般都以**同源四聚体**的形式存在于细胞中，即 4 个相同的多肽亚基组装在一起（图 9.7A）。将显性负效应的概念和这个观察到的四聚体形态综合考虑，可以推测到突变的 *p53* 等位基因可以有效地干扰在同一个细胞中表达的持续起作用的野生型 *p53* 等位基因。

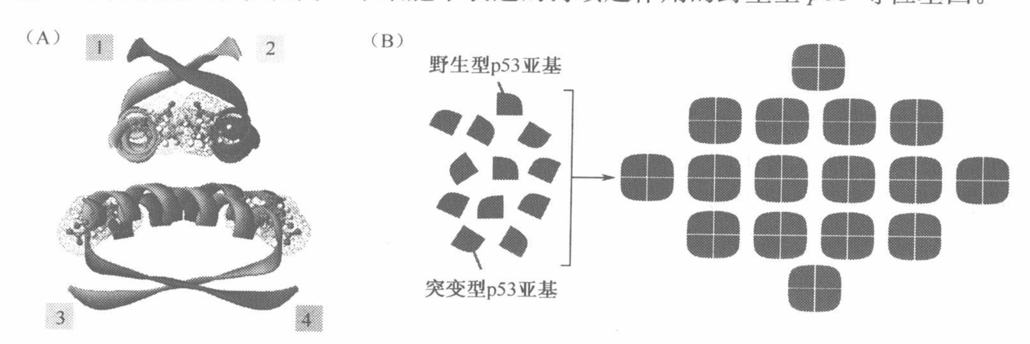


图 9.7　*p53* 显性负突变的机制　(A) 通过运用 X 射线而得知，p53 蛋白的四聚体化结构域由 α 螺旋组成。在肿瘤中发现的突变 p53 蛋白通常仍具有这个结构域，所以它们可以和其他突变的 p53 蛋白或者野生型的 p53 蛋白结合形成四聚体。这个结构域也使得 p53 能够与其他相关蛋白形成异源四聚体（补充材料 10）。这个螺旋的末端氨基酸的改变能使四聚体结构不稳定，与一种罕见的家族性易感肿瘤相关（信息栏 9.5）。这里用 4 种不同的颜色表示了这 4 个螺旋结构域，两两通过右侧转角组装。(B) p53 蛋白通常作为一个同源四聚体形式的转录因子起作用。但是，当细胞中存在一个突变了的 *p53* 等位基因，它编码结构上发生改变的蛋白质。这个突变的蛋白质可能仍然具有形成四聚体的能力但却丧失了 p53 的正常功能。由不同组分的野生型（蓝色）和突变（红色）的 p53 蛋白亚基组成的杂合四聚体，甚至只含有一个突变型的蛋白质亚基都可能导致整个四聚体的功能受损。因此，一个 *p53* 基因杂合的细胞中，15/16 的蛋白质都缺乏完整的正常功能。（A，from E. L. DiGiammarino et al.，Nat. Struct. Biol. 9：12-16，2002.）

假设人类肿瘤细胞中一个突变的 p53 等位基因编码了一个失去正常功能但是仍能形成四聚体的 p53 蛋白，如果这个突变的等位基因和野生型的等位基因在此细胞中共存，这个细胞中的 p53 四聚体将是包含了不同比例的突变的 p53 蛋白以及野生型 p53 蛋白。四聚体之一突变的 p53 蛋白就会干扰整个四聚体的功能。图 9.7B 表示突变及野生型 p53 单体可能的 16 种组合中的 15 种情况，包含了至少 1 个突变的 p53 亚基可能因此缺乏部分或者全部的野生型 p53 四聚体的功能。在这种杂合子细胞中（包含一个突变和一个野生型拷贝），只有 1/16 的 p53 四聚体可以完全由野生型的 p53 亚基组成，并具有完整野生型的功能。

将一个突变的 *p53* cDNA 克隆导入（转染）含有一对野生型 *p53* 等位基因的细胞中，这个导入的等位基因通常都带有一个高活性的转录启动子，比细胞自身的 *p53* 拷贝启动子活性高得多。所以，在这种转染的细胞中，突变的 p53 蛋白表达量会比内源性的正常 p53 蛋白高得多。因此，在这种细胞中，完全由野生型 p53 亚基形成的 p53 四聚体所占的比率远远少于 1/16。这解释了为什么导入的突变 *p53* 等位基因能够高效地影响这些细胞中 p53 的功能。

按照以上的逻辑，许多人类肿瘤细胞在失去 p53 功能后变得恶性程度更高，可能是由

于它们携带了一个野生型和一个突变型的等位基因。实际上，在 *p53* 基因座突变的大多数人类肿瘤细胞中，都发现了 *p53* 基因的杂合性丢失（LOH），这些细胞中野生型的等位基因被清除，产生了具有两个突变 *p53* 的等位基因。因此，在这些细胞中，一个 *p53* 基因在开始时被突变，接下来剩下的野生型 *p53* 基因也通过杂合性丢失机制被清除。

对于初期的肿瘤细胞来说，显性负等位基因的突变显然比缺失此等位基因而导致完全不能编码 p53 蛋白要更有利。显性负等位基因可以导致 15/16 的 p53 功能失效，而缺失此等位基因最多能导致 p53 功能损失一半（实际上，如果 p53 蛋白在细胞中的水平是被精细调控的，那么这个缺失等位基因细胞的 p53 浓度则不会有太大的影响，因为剩下的那个野生型等位基因将通过产生更多的野性型蛋白来补偿）。

为何一定要除去剩余的那个野生型 *p53* 等位基因？答案似乎在于剩下的那 1/16 的正常功能 p53 中，即这一小部分似乎都不能被大多数的肿瘤细胞所忍受。所以，为了更好地增殖，它们丢弃了剩下的那个野生型 *p53* 等位基因。关于胚胎干细胞的遗传学研究为 p53 显性负模型提供了更多的证据（信息栏 9.1）。

9.4　p53 蛋白分子半衰期通常较短

p53 蛋白在许多正常细胞和瘤细胞中的核定位提示此蛋白可能作为一个转录因子（TF）而发挥功能。目前至少已知三种调控转录因子活性的机制：①调控转录因子在核内的水平；②转录因子在核内的水平保持恒定，但其活性必须由一些共价修饰的辅助；③调控某个共同转录因子水平。在一些情况下，这三种机制共存。对于 p53 来说，第一种机制——p53 蛋白水平的改变是主要的。p53 蛋白水平在不同类型的细胞中有着巨大的差别，而且当细胞暴露在某些生理学压力下会快速地提高。

这些发现提出了一个疑问，p53 蛋白的水平是如何被细胞调控的？许多细胞中的蛋白质分子，一旦被合成就能持续数十或者数百个小时（如在指数生长期的细胞中，形成核糖体亚基的蛋白质，似乎能维持许多天）。同时，其他许多蛋白质的代谢是高度不稳定的，几乎一合成就被降解。区分这两类蛋白质的一个方法是用放线菌酮处理细胞，这是一种能抑制蛋白质合成的药物。在对具有野生型 *p53* 等位基因的细胞进行处理后，p53 蛋白的半衰期大约在 20min。这说明 p53 是一种高度不稳定的蛋白，在被合成后不久即被降解。

信息栏 9.1　突变的胚胎干细胞证实了 *p53* 突变等位基因显性负效应　关于 *p53* 突变等位基因的显性负效应的重要证据来源于对胚胎干细胞遗传学处理，通过同源重组的方法将点突变导入内源的 *p53* 基因拷贝中（见信息栏 7.10）。在这个实验中，两组细胞的基因组分别被导入了两种不同的单核苷酸改变，会导致 p53 蛋白 DNA 结合区的氨基酸改变。这两个突变等位基因反映了人类肿瘤基因组中高频率的突变。

这些突变的细胞在 p53 的功能上会大打折扣。相反，其他那些缺少两个 *p53* 基因拷贝其中一个的 ES 细胞，在受到某些生理学刺激时，p53 的功能与野生型的细胞相比几乎没有很大的区别。这些证据更加有力地说明了许多突变的 p53 会干扰与其共同表达的野生型 p53 的功能。

这种合成后立即降解的过程几乎是一个“无用的循环”，对于细胞来说这是一种高

度的浪费。为什么一个细胞会浪费能量和物质来合成一个几乎合成以后就马上降解的蛋白呢？而且其他的蛋白质如 Myc 也有类似的情况（6.1 节）。

在这个表面上看起来浪费的背后，其实是一个很简单道理：细胞在受到某些生理学信号刺激后需要通过增加或者降低某种蛋白质的水平作为应答。从原理上说，可以通过调控编码 mRNA 的水平或者此 mRNA 的翻译速率来完成这样的调节。但是，对于某个关键的蛋白质更为迅速的调控可以通过使其稳定性增加或者降低来完成。例如，一个细胞中的 p53 蛋白浓度可以通过抑制降解使其在 20min 内加倍。

在正常情况下，一个细胞会持续高速率地合成 p53 蛋白并且快速地降解它们，以达到一个平衡。这样的结果是在细胞中处于稳定状态的此蛋白水平很低。由于某些生理学信号的刺激，p53 蛋白降解被阻断，导致细胞内 p53 蛋白水平快速增加，这个发现提出了一个更深层次的问题，为什么一个正常细胞需要精细地调节 p53 蛋白水平，以及什么样的信号会导致细胞停止 p53 的降解，从而使得此蛋白质表达水平快速上升？

9.5　许多信号都能诱导表达 p53

20 世纪 90 年代早期，发现了很多能诱导 p53 蛋白水平快速升高的因子。包括 X 射线、紫外线、某些能损伤 DNA 的化疗药物、DNA 合成抑制剂以及分解细胞骨架中微管蛋白的因子。在把细胞暴露于这些因子中几分钟后，p53 很快就由之前的低水平增至大量而被检测到。p53 蛋白被快速诱导表达的同时，*p53* mRNA 水平却没有明显变化，因此可证明并不是由于 *p53* 基因的转录水平增加而导致的。实际上，升高的蛋白质水平完全是因为 p53 蛋白转录后的稳定性发生了改变。

在接下来的几年研究里，对能够引起 p53 水平改变的生理学信号又有了重大的发现，其中包括低氧（缺氧）。无论正常或者是恶性的细胞，当循环不够导致血液中氧气携带量不足时都会出现。接下来还发现，将 *myc* 或者腺病毒携带的癌基因转入细胞后也能引起 p53 水平的上调。

这些发现说明存在很多负责监控细胞系统完整及功能的传感器。当这些传感器监测到损伤或者异常时，它们将信号传递给 p53 及其调节器，导致细胞中 p53 水平快速升高（图 9.8）。

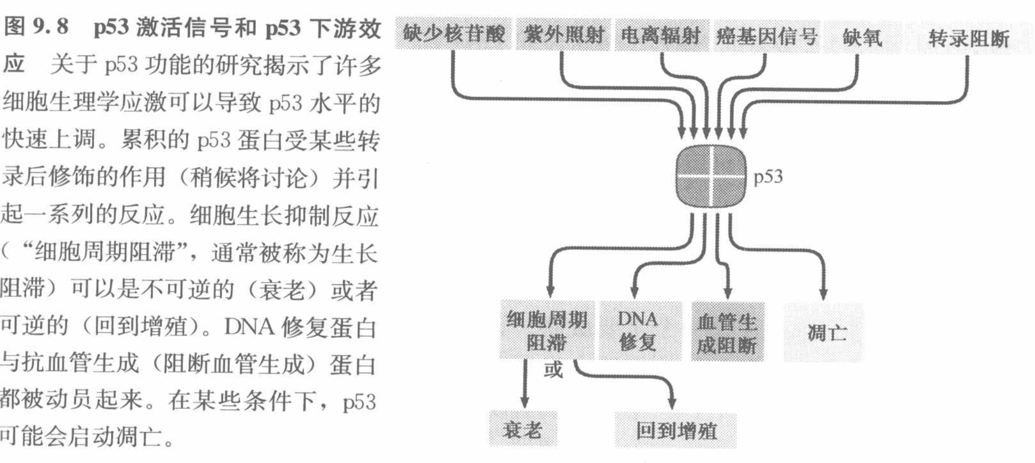


图 9.8　p53 激活信号和 p53 下游效应　关于 p53 功能的研究揭示了许多细胞生理学应激可以导致 p53 水平的快速上调。累积的 p53 蛋白受某些转录后修饰的作用（稍候将讨论）并引起一系列的反应。细胞生长抑制反应（“细胞周期阻滞”，通常被称为生长阻滞）可以是不可逆的（衰老）或者可逆的（回到增殖）。DNA 修复蛋白与抗血管生成（阻断血管生成）蛋白都被动员起来。在某些条件下，p53 可能会启动凋亡。

能导致 p53 上调的**遗传毒性**（如 DNA 损伤）因子以及生理学信号在某些条件下能使**细胞生长抑制**，导致细胞循环停止，通常被称为“生长抑制”。在另一些情况下，这些应激信号可能启动凋亡（细胞自杀）程序。将这些发现综合考虑，可以得到一个惊人的结论：那些能引起细胞生长阻滞或者凋亡的毒性因子同时也能上调 p53 水平。因为这些发现只是具有相关性，所以并不能有力地证明 p53 参与到了毒性或者应激刺激导致的细胞生长阻滞或者凋亡中。

决定性的证据来源于对于 p53 功能的详细研究。例如，当遗传毒性因子，如 X 射线，诱发细胞内 p53 水平升高时，$p21^{Cip1}$ 蛋白水平也相应地升高（见 8.4 节），然而在 *p53* 突变的细胞中则不发生这样的现象。这说明 p53 蛋白能通过诱导 CDK 抑制剂的表达来阻滞细胞周期（图 9.9）。实际上，对电离辐射的长效生物学反应通常都与细胞中 *p53* 基因的情况有关。因此，携带突变 *p53* 等位基因的细胞与野生型细胞相比，同时暴露于应激原时，进入细胞阻滞或者凋亡的倾向明显要小（图 9.10）。

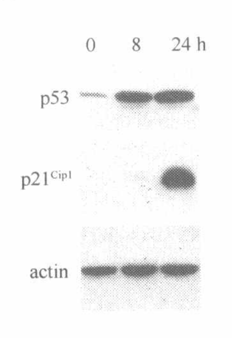


图 9.9　DNA 损伤后 p53 及 $p21^{Cip1}$ 的诱导　细胞在受到 X 射线照射后，p53 水平明显升高。一旦在高浓度下（8h、24h）功能被激活（此处未检测），p53 将诱导 $p21^{Cip1}$ 蛋白表达（8.4 节）。$p21^{Cip1}$ 起到一个潜在的 cyclin-CDK 复合物中 CDK 抑制剂的作用，在 G_1、S、G_2 及 M 晚期发挥功能并且能在细胞周期的任何一个时期阻滞细胞的进一步增殖。全部的三个样品，包括对照都以 actin 蛋白作为内参，以保证蛋白质电泳时各个样品的上样量一致。(Courtesy of K. H. Vousden.)

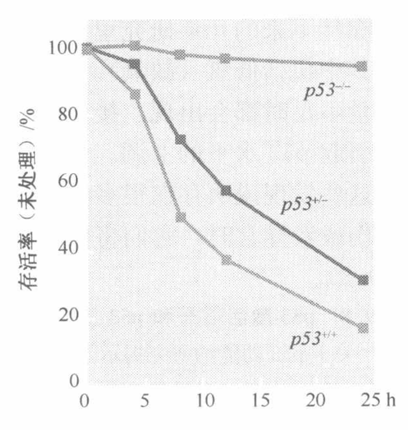


图 9.10　*p53* 基因型与电离辐射后细胞的反应　野生型小鼠的胸腺细胞（来自胸腺的粒细胞）在电离辐射 25h 后有 80%失去生存能力（绿色），而在 $p53^{+/-}$ 杂合型小鼠（一个野生型一个缺失的等位基因）中，几乎同等比例的胸腺细胞存在生存能力的丧失（红色）。相反，来自 *p53* 纯合子突变小鼠的胸腺细胞，只有少于 5%的细胞在此期间失去生存能力（蓝色）。在这些情况下，细胞生存能力的丧失主要是由于凋亡。(From S. W. Lowe et al., Nature 362：847-849，1993.)

综合考虑，这些发现可以整合成一个简单统一的机制模型：p53 持续地接受多种监控系统传出的信号。如果 p53 接收到特殊的警告信号，它将阻止细胞的增殖或者启动凋亡程序（图 9.8）。

实际上，p53 具有的抑制细胞生长和促进细胞凋亡的功能，对于那些向恶性生长期进展的初期肿瘤细胞来说是一个主要威胁。许多应激，包括缺氧、基因组损伤以及调控细胞增殖的信号通路失调是肿瘤细胞在发展成肿瘤的各个时期都会经历的。在这些应激条件中任一种存在的情况下，一个完整的有功能的 p53 警告系统威胁着可能导致肿瘤的细胞。因此，这些细胞如果要生存或者增殖，p53 的活性必须被减弱或者完全去除。

这解释了为什么大多数或者可能所有的人类肿瘤细胞的 p53 警报系统必须部分或者全部失活。没有了 p53 负责，肿瘤细胞可以忍受缺氧、基因组的多种损伤以及它们生长调控通路的失调。一旦一个细胞获得了对这些原本能使其受损的因子的抗性后，它们及其子细胞便为恶性生长铺好了道路。同样，正常细胞也需要避免 p53 过度的活性，因为它威胁到了它们的生存，并且引起维持正常身体功能细胞的缺失（补充材料 6 ◎）。

9.6 DNA 损伤以及失调的生长信号导致 p53 稳定

当检测到损伤或者信号失衡时，将会有监控系统发送报警信号给 p53，其中有三个研究得比较清楚。第一个监控系统是对染色体 DNA 双链断裂应答，值得注意的是这些断裂是由电离辐射引起的，如 X 射线。实际上，基因组中任何一个位置的双链断裂都足够引起 p53 水平的上调，现在还不清楚是哪种蛋白检测到了双链的断裂，但已经知道将信号传递给 p53 的是 ATM 激酶（在第 12 章中会有介绍，ATM 的缺乏将导致共济失调毛细血管扩张的疾病，并使细胞对 X 射线产生超敏反应）。接下来，ATM 将信号传递到 ATR（ATM 相关）激酶，此激酶能磷酸化 p53；ATM 也能直接磷酸化 p53，磷酸化的 p53 能够不被降解。

第二条信号通路可以被许多 DNA 损伤因子激活，包括某些化疗药物及紫外线照射，某些蛋白激酶抑制剂也能激活这条通路。这取决于 ATR 激酶将信号传递给酪蛋白激酶 II（CKII），它随即磷酸化 p53。

第三条通路是由异常的生长信号引起的 p53 激活，特别是那些由 pRb-E2F 控制的细胞周期发生紊乱时。这条通路并不依赖于激酶介导的 p53 水平改变及其发出的信号。由其他生理学因素或失衡引起的 p53 水平改变的机制，如缺氧等，仍然不太清楚。

这些错综复杂的信号通路说明了哺乳动物细胞的脆弱。它委托信号蛋白 p53 接受来自负责监控许多重要的细胞内生理及生化活动的系统发出的信号（图 9.8）。多种信号汇聚到单个的蛋白质，形状类似于一个漏斗，显示了一个精妙和经济的细胞信号通路。但这也给细胞带来一个最大的弊端，因为一旦失去这个调控通路的蛋白，细胞将灾难性的失去监控自身健康的能力，并且将不能对某些系统的失活采取适当的对抗措施。

在一次打击后（实际上，两次打击能使 *p53* 基因的两个拷贝失活），细胞变得对自身的故障开始视而不见。由此它们获得了在某些环境下持续增殖的能力，而在正常情况下这些环境会导致细胞增殖抑制或者进入凋亡。另外，我们即将会讲到，失去了由 p53 促进的 DNA 修复及稳定基因组的功能，$p53^{-/-}$ 细胞的子代将获得更多的突变并且在向形成恶性肿瘤的道路上更快地迈进（如信息栏 9.2）。

信息栏 9.2　日光、p53 和皮肤癌　p53 蛋白是对抗日光引起的皮肤癌的重要守护者。当皮肤中的**角质化细胞**受到较多紫外线-B 的辐射时，p53 将快速地升高并导致细胞凋亡。一个明显的特征就是在日光照射后的若干天，皮肤开始脱落。同时，紫外线-B 也可能导致突变以及角质化细胞中 p53 的功能失活。这些可以在人类皮肤鳞状细胞癌中得到验证，此细胞中等位基因的突变通常发生在双嘧啶区，而紫外线-B 射线恰恰能造成嘧啶-嘧啶交联（12.6 节）。这些突变的 *p53* 等位基因同样也可以在长期受到阳光损害但外表上正常的皮肤中发现。一旦 p53 的功能由于这些突变丢失，角质化细胞就可以在后继的紫外线-B 辐射中存活下来，因为 p53 蛋白不能再引起凋亡。这些 *p53* 突变

的细胞可能会获得更多额外的突变等位基因，从而使得它们得以形成鳞状细胞癌。有趣的是，缺乏功能型 *p53* 基因拷贝的小鼠在紫外线 B 的照射下，也会形成眼黑色素瘤，即眼睛色素细胞的肿瘤；人类中类似的肿瘤也被怀疑是由紫外线引起的。

9.7　Mdm2 和 ARF 为 p53 的命运而战

多种可以影响到 p53 的警报信号都有一个共同的作用——导致 p53 蛋白水平的快速升高。研究人员开始了解这个戏剧性的变化是如何发生的。像许多细胞蛋白一样，p53 蛋白是由泛素蛋白酶体系统降解的。如信息栏 7.8 所述，由这个系统降解的蛋白都会首先被多聚泛素链共价的结合标记，然后被转运到蛋白酶体中，并在其中被消化成为寡肽。这个过程中最为关键的一步是起始的标记过程。

在正常的未被搅乱的细胞中，p53 的降解是由叫做 Mdm2（小鼠中）和 Hdm（人类细胞中）的蛋白调控的。此蛋白将 p53 作为一个合成后需要立即被泛素化标记的靶蛋白来识别（图 9.11）。Mdm2 最初是在鼠类肉瘤细胞中发现，由细胞染色体中的双微体（double-minute chromosome）编码。接下来，发现人类中 *mdm2* 的同源基因在肉瘤中经常扩增。在许多人类肺癌中，Mdm2 都是过表达的，但其机制还不清楚。

因为还与其他癌基因相关，*mdm2* 基因的扩增似乎给肿瘤细胞提供了某种直接的增殖优势。Mdm2 蛋白一被鉴定出来，就明晰了它作为 p53 降解的媒介。实际上，Mdm2 对于 p53 的具体作用比上面描述的要稍微复杂一些。

我们下面将介绍，p53 作为一个转录因子来起作用；Mdm2 与 p53 结合立即使其调节转录的功能失活。此后，Mdm2 介导泛素与 p53 的连接并将 p53 从核内（p53 主要在核内起作用）转运到细胞质的蛋白酶体中（图 9.11）。Mdm2 连续而高效地运作保证了 p53 在正常未受刺激的细胞中 20min 短暂的半衰期。

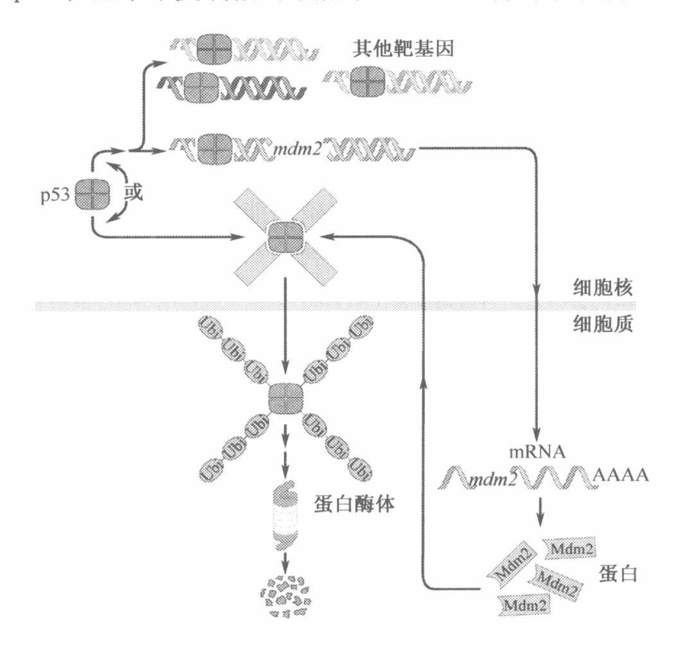


图 9.11　由 Mdm2 控制的 p53 水平　在某些生理刺激后 p53 浓度上升（此处未显示），p53 四聚体与众多的靶基因启动子区结合，这些靶基因的转录由 p53 诱导（上）。在这些基因中，还包括 *mdm2*，导致了 *mdm2* mRNA 以及 Mdm2 蛋白水平的上升（右）。一旦合成，Mdm2 分子就与 p53 蛋白亚基结合，并使其泛素化并被转运至胞质中的蛋白酶体降解。这个负反馈环保证了 p53 最终回落到一个较低的水平以及在正常细胞中保证 p53 处于一个非常低的状态。

在某些环境下，特别是细胞遭遇某些类型的刺激或者损伤，p53 必须免除 Mdm2 对它们的降解，来发挥在细胞中的重要功能。一般来说都是通过磷酸化来实现的，Mdm2 不能与磷酸化的 p53 结合，故不能使其泛素化。p53 的磷酸化氨基酸残基位于 N 端结构域（图 9.12)。激酶如 ATM、Chk1 和 Chk2（在 DNA 损伤后激活）改变了 p53 蛋白结构中通常被 Mdm2 识别并结合的结构域，从而通过这个方式避免 Mdm2 与 p53 的结合（图 9.13)。同时，ATM 激酶可以磷酸化 Mdm2 并使其功能失活。当 p53 和 Mdm2 都被磷酸化以后，Mdm2 不能起始 p53 的泛素化，而 p53 则不被降解，其在细胞中的浓度急速增加。一旦浓度增加，p53 将引起一系列的下游反应，下面将详细介绍。

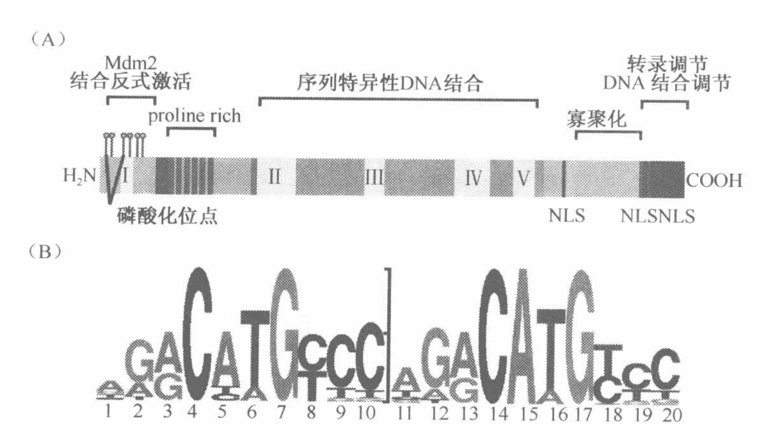


图 9.12　p53 的特殊结构域　(A) p53 蛋白通过其中心的 DNA 结合结构域与 DNA 结合（黄色，绿色）。它与 Mdm2 的结合区（如图 9.11）在靠近 N 端的一个小的结构域，而它的转录激活区（参与转录的激活）也在此处。在此区域内的 p53 氨基酸残基的磷酸化阻止了 Mdm2 的结合并且使得 p53 不能被泛素化及降解。在其 C 端，有一个寡聚化结构域（灰色，如图 9.7A），保证它能形成四聚体。C 端同时也是核定位信号（NLS，红色），保证 p53 能转运入核。靠近 N 端的酪氨酸富集区（蓝色）负责 p53 的凋亡功能。(B) 通过运用抗 p53 抗体，免疫共沉淀了人类细胞染色质中的 p53-DNA 复合物。对于沉淀物中 DNA 片段精细的序列分析得到人类基因组中 p53 结合的 452 个位点。此处显示的与 p53 结合 DNA 序列，字母的相对大小表示在结合位点上一个 DNA 碱基出现的频率。(A, from D. E. Fisher, ed. Tumor Suppressor Genes in Human Cancer. Totowa, NJ: Humana Press, 2000; B, from C. L. Wei, Cell 124: 207-219, 2006.)

Mdm2 在这里起着癌蛋白的作用，但它与其他在第 4、5、6 章中介绍的癌蛋白的作用机制却非常不同。后者是以促有丝分裂信号级联的组件而起作用的，并通过模仿那些生长因子与它们受体结合后激发的信号诱导细胞的增殖。相反，Mdm2 通过对抗 p53 并由此抑制细胞进入细胞周期阻滞，进入不生长的**衰老期**或者进入凋亡程序。当然，最后的结果是一样，癌蛋白与 Mdm2 都能使细胞数量增加。

Mdm2 蛋白的活性及水平由其他正信号或者负信号调节。这个信号通路使细胞在激活 PI3 激酶（PI3K）通路后，通过 Akt/PKB 激酶引起 Mdm2 的磷酸化（与之前提到的可以被 ATM 激酶修饰的位点不同），将 Mdm2 从细胞质中转入核中，并在核中与 p53 作用（图 9.12)。因为 PI3K 本身由 Ras 和生长因子受体激活，我们逐渐了解到促有丝

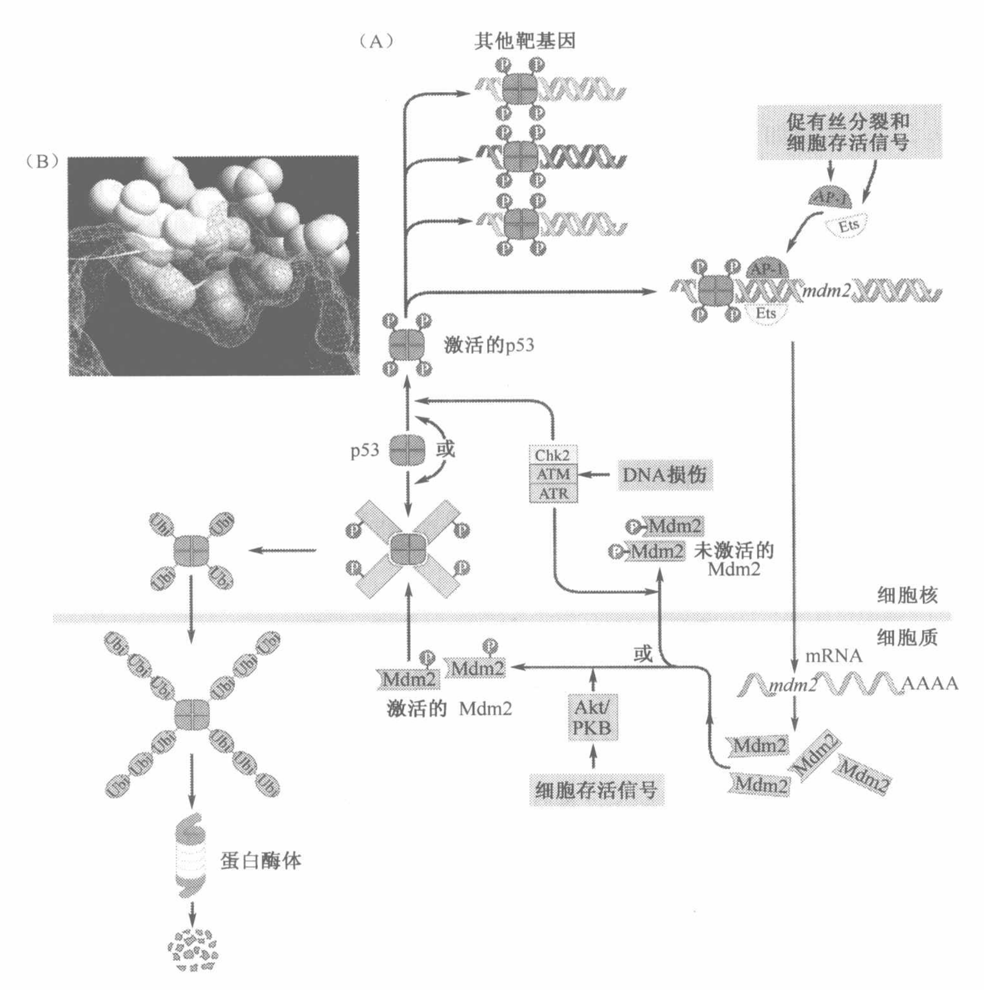


图 9.13　由多种激酶控制的 p53 水平　(A) 图 9.11 中所示的 p53 合成和降解的循环可以被一系列的调节器调控。DNA 损伤传感激酶，如 ATM 和 ATR 直接或者通过 Chk2 间接地磷酸化 p53（中间）的 N 端结构域（如图 9.12），使得 Mdm2 不能与其结合（金色，左中）。同时这些激酶对 Mdm2 分子的磷酸化也能阻止它们与 p53 的结合（中间）。这些修饰使得 p53 免于 Mdm2 介导的结合、泛素化以及在蛋白酶体（左下）中的降解。与此相反，某些生存信号（如促有丝分裂生长因子释放的信号），通过 AP-1 和 Ets 转录因子而发挥作用，与 p53 一起促进 *Mdm2*（右中）基因的表达，继而提高 Mdm2 的 mRNA水平以及蛋白的合成（右下），这些生存信号同样也能激活 Akt/PKB 激酶，磷酸化 Mdm2 的另外一个位点并使其激活（下）。被激活的 Mdm2 将与 p53 结合并启动其泛素化以及蛋白酶体介导的降解途径（右下）（近来的证据显示 p53 首先在核内单泛素化然后再进入细胞质后多聚泛素化）。(B) 通过 X 射线晶体衍射技术研究 p53 与 Mdm2 结合界面的结构。p53 的作用结构域用黄色填充模型表示，包括 p53 蛋白上的 18～27 残基，与之互补的 Mdm2 表面结构用蓝色网线表示。由激酶如 Chk2、ATM 和 ATR 对 p53 进行的磷酸化阻碍了这种相互作用，使 p53 避免由 Mdm2 介导的泛素化以及后续的降解。(B，from PH. Kussie et al.，Science 274：948-953，1996.)

分裂信号通路确实可以影响 Mdm2 从而影响 p53，即使是间接的。同时，促有丝分裂的信号通路的激活，Ras→ Raf→ MAPK 能通过 Ets 和 AP-1（Fos ＋ Jun）转录因子，大幅度提高 *mdm2* 基因的转录，产生高水平的 *mdm2* mRNA 及蛋白。提高的 Mdm2 蛋白水平通过 PI3K→Akt/PKB 信号通路增加了磷酸化激活的 Mdm2。最后，这些效应都导致了 p53 蛋白水平的抑制。

然而另外一个影响 Mdm2 的机制却通过一个 Mdm2 拮抗物的发现而被发现，即小鼠细胞中的 $p19^{ARF}$ 和人类中的 $p14^{ARF}$。精确的序列分析发现了后来被命名为 *ARE* 的基因。这个编码基因最早在小鼠细胞中被发现，它的序列与 $p16^{INK4A}$ 基因重叠，后者是 CDK4 和 CDK6 激酶的一个重要的抑制剂，可起始 pRb 的磷酸化（8.4 节）。

通过使用 $p16^{INK4A}$ 启动子上游 13kb 处的启动子转录以及可变剪切，合成了一个编码可变可读框的 mRNA，ARF 蛋白的结构（见图 9.14）。在野生型啮齿类动物细胞中表达 ARF 蛋白编码的 cDNA，可以对细胞增殖产生强有力的抑制作用。但是，当将 ARF cDNA 转入缺少野生型 p53 功能的细胞中时，这种抑制作用却没有发现。这说明 ARF 的生长抑制功能完全依赖细胞中的有功能的 p53 的存在。

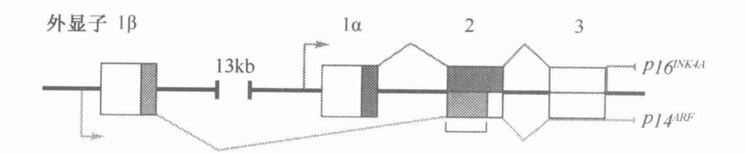


图 9.14 编码 $p16^{INK4A}$ 和 $p14/19^{ARF}$ 的基因 对于 $p16^{INK4A}$（红色）基因的分析揭示了它的第二外显子与小鼠中一个编码 19kDa 蛋白的基因以及人类中一个编码 14kDa 蛋白的基因重叠。编码这个 p14/p19 蛋白的基因通过一个可变的转录启动子（蓝色箭头，左），在 $p16^{INK4A}$（红色箭头，中间）启动子上游约 13kDa 处。因为其 mRNA 翻译在第二外显子中（红色，蓝色）有一个可变可读框（括弧），产生的蛋白以及基因因此被命名为 $p19^{ARF}$（或者在人类中被称为 $p14^{ARF}$）。这两种重叠基因的 RNA 的剪切方式用多个外显子之间的插字符连接表示。盒状表示外显子，而外显子中的填充部分表示可读框。（From C. Sherr，Genes Dev. 12：2984-2991，1998.）

进一步的研究发现，在野生型细胞中，ARF 的表达可以导致 p53 水平的快速上调。现在已经研究清楚了这个反应的分子机制，ARF 与 Mdm2 结合并抑制其功能，似乎是通过将 Mdm2 隔离在核仁中，即产生核糖体亚基的地方（图 9.15A）。

一旦将 Mdm2 与 p53 的相互作用阻断，p53 就能逃离 Mdm2 介导的泛素化以及降解，并由此在细胞内快速高水平的累积。敌人的敌人就是朋友。ARF 能够快速诱导 p53 水平的上调就是因为它能结合并抑制 p53 的敌人——Mdm2。

重要的是，在正常情况下未处理的细胞中，Mdm2 必须发挥其正常功能以保证 p53 维持在一个较低的水平。否则，p53 将达到一个细胞无法耐受的高水平，从而导致对于细胞增殖不适当的抑制以及诱导凋亡（信息栏 9.3）。

信息栏 9.3　Mdm2 和 p53 生死相连　Mdm2 和 p53 相互间的拮抗作用通过在小鼠胚胎基因组中失活的 *mdm2* 两个基因拷贝而越发明显。这些胚胎在发育早期就死亡，原因是在胚胎细胞中 p53 水平到了生理承受的极限，阻碍了胚胎细胞的正常增殖，从而引起死亡。正如我们在前面（9.2 节）讨论的，*p53* 基因的两个拷贝都失活在小鼠胚胎的发育中没有影响，但是，当两个基因同时在小鼠胚胎中失活（产生 $Mdm2^{-/-}$ $p53^{-/-}$ 基因型），胚胎的发育相当的正常。综合考虑，这些结果说明 *Mdm2* 基因失活而引起的 p53 活性失控可以通过在细胞中除去 p53 而逆转过来。这种既清楚又含糊的结果在此类实验中是很少见的，因为大多数的基因和蛋白都有着众多的功能，像这种戏剧性的简单试验结果非常罕见。

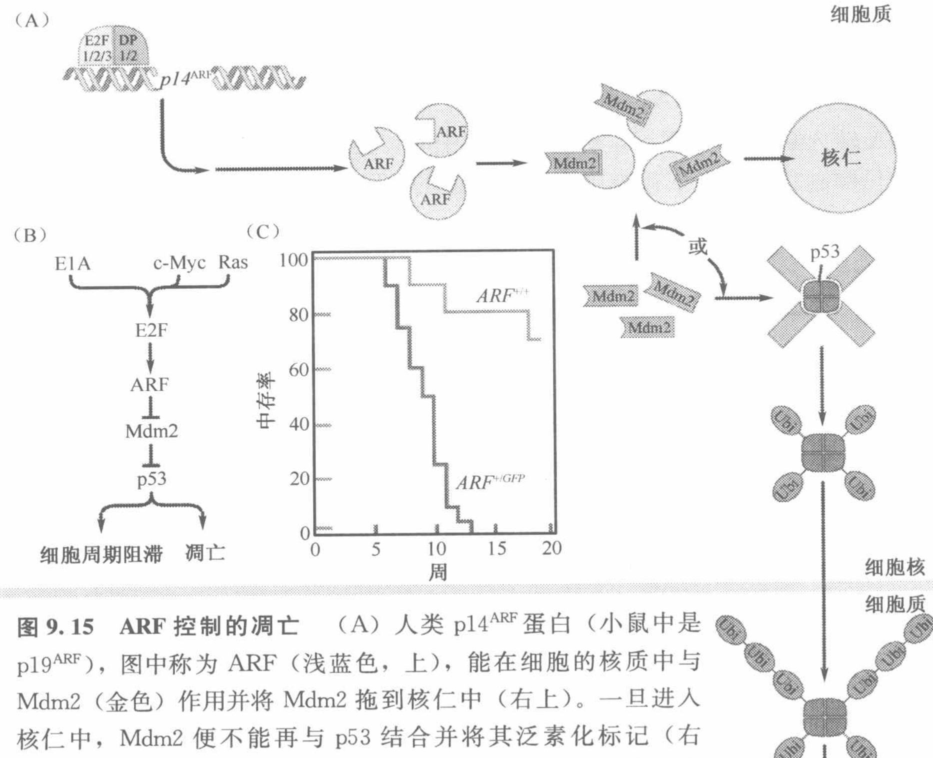


图 9.15　ARF 控制的凋亡　(A) 人类 $p14^{ARF}$ 蛋白（小鼠中是 $p19^{ARF}$），图中称为 ARF（浅蓝色，上），能在细胞的核质中与 Mdm2（金色）作用并将 Mdm2 拖到核仁中（右上）。一旦进入核仁中，Mdm2 便不能再与 p53 结合并将其泛素化标记（右下）。由此，上调的 ARF 能导致 p53 水平的增加。(B) 许多致癌的信号能通过诱导 E2F 活性来诱发凋亡，而 E2F 的激活能提高 ARF 的表达。这些信号包括腺病毒 E1A、Myc（= c-Myc）以及 Ras 癌蛋白。这说明这些信号通路通过高活性的 E2F 信号来清除有缺陷的细胞。(C) 在小鼠生殖细胞系中将一个 GFP（绿色荧光蛋白）编码序列替换一个 $p19^{ARF}$ 编码基因拷贝。这些小鼠（ARF^{+}/GFP，红色线）以及野生型小鼠（$ARF^{+/+}$，绿色线）都被转入 *Eμ-myc* 基因，它会导致 B 细胞淋巴瘤（图 9.22）。$ARF^{+/GFP}$ *Eμ-myc* 小鼠比那些只带有 *Eμ-myc* 的小鼠更易产生致死性肿瘤，而且这些肿瘤的细胞会丢失那个仅存的野生型 *ARF* 等位基因。因此，在没有 ARF 功能的情况下，癌基因 *myc* 的诱导凋亡效应将大量丧失，使得细胞增殖占主导并形成肿瘤。(B, courtesy of P. J. Iaquinta and J. A. Lees; C, from F. Zindy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 15930-15935, 2003.)

图 9.15 所示的多种拮抗作用让 ARF 与 p53 结成了同盟，成为一个像 p53 一样的肿瘤抑制蛋白。在许多人类肿瘤中都监测到由遗传学突变或者启动子甲基化引起的 $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ 基因座的失活。一旦细胞丧失了 ARF 活性，它就失去了阻断 Mdm2 的功能。后果是 Mdm2 将会自由地促进 p53 的降解，细胞将因为 p53 无法在细胞中累积到有用的水平而失去功能。由于 ARF 在提高 p53 水平上有着重要的作用，$p14^{ARF}$ 基因与 *p53* 基因一样，在细胞中是一个重要的肿瘤抑制基因。此外，在多种保留着野生型 p53 拷贝的人类肿瘤中，似乎是通过失活两个编码 ARE 的基因拷贝来去除 p53 的功能。最后，我们必须注意到，$p16^{INK4A}$ 和 $p14^{ARF}$ 基因（图 9.14）的共定位也带来了由集中产生的对于正常细胞的额外易损性（信息栏 9.4）。

信息栏 9.4　哺乳动物细胞将许多鸡蛋放在一个篮子里了吗？ 在大约一半的人类肿瘤中由于各种原因失活的 $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ 基因座被发现使得提出了一个有意思的问题：哺乳动物细胞为什么会冒险将两个能编码调控重要肿瘤抑制作用蛋白 pRb 和 p53 的基因放在同一个染色体基因座上？这个基因座的缺失会导致这两个通路正常调控的同时丧失。单就 *p53* 而言，重大的功能被集中在一个基因座上。

对于哺乳动物细胞来说，将两个如此重要的鸡蛋放在一个遗传学的篮子里似乎是一种愚蠢的做法，因为只要失去这一个基因，细胞就会有两种类型的失调。更糟的是，另外一个能编码 pRb 磷酸化重要调节蛋白 $p15^{INK4B}$ 的基因（8.4 节），与 $p16^{INK4a}/p14^{ARF}$ 的基因座也是连锁的，并且非常之近，以至于仅仅缺失 40 kb 的染色体 DNA 就可以导致所有这些遗传元件的丢失。我们还不太清楚这个遗传学排列的潜在原理，也许根本没有。哺乳动物的进化过程中可能形成了细胞调控机制中的一个并非最佳的设计。

9.8　ARF 和 p53 介导的凋亡通过监控胞内信号来预防肿瘤

ARF 对于 p53 水平的重要调控作用提出了另一个问题，ARF 自身是如何被调控的？在这个例子中，我们在第 8 章关于 pRb 通路的讨论与此非常相关，哺乳动物细胞对于高于正常细胞水平的 E2F1 活性非常敏感。实际上，细胞似乎监控着这个特殊的转录活性水平。pRb 通路是否正常行使功能可以通过一些因素（可能是 E2F2 和 E2F3 一起）来指示，过高水平的 E2F 转录因子活性为 pRb 功能失调提供了证据。

对于那些由于失去 pRb 正常调控（图 9.16）而 E2F 活性太高的细胞，进化过程中产生了许多种去除它们的办法。失控的 E2F1 活性调控了许多直接参与凋亡程序的蛋白，包括编码 **caspase**（3、7、8 和 9）、Bcl-2 相关蛋白（Bim、Noxa、PUMA）、Apaf-1 以及 p53 类似蛋白 p73 的基因。这些蛋白共同诱导细胞进入凋亡，我们将在后面详细介绍。

另外，p53 依赖的凋亡程序经常被上调的 E2F 活性激活。在 $p14^{ARF}$ 基因的启动子区有一个 E2F 的识别序列，在某种目前还不太清楚的机制下，非正常水平的 E2F1 或者 E2F2 活性诱导了 $p14^{ARF}$ mRNA 的转录。ARF 蛋白很快出现并阻断了 Mdm2 的活性，p53 得以累积并启动凋亡（图 9.15A、B）。信号级联如下所示：

pRb⊣ E2F→ARF⊣ Mdm2⊣ p53→apoptosis

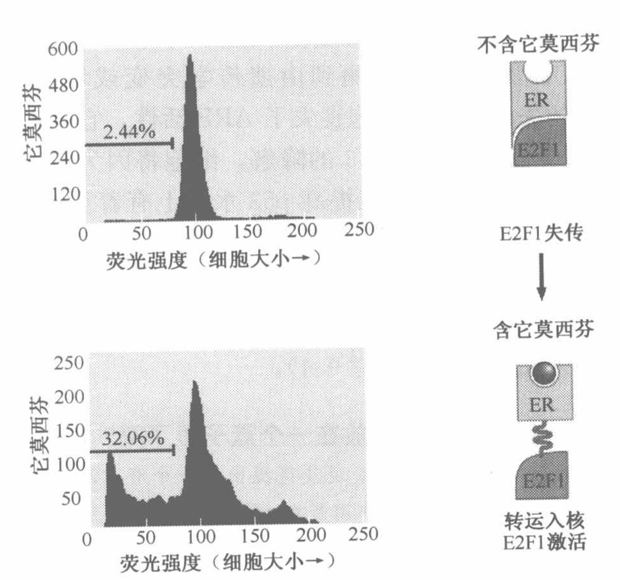


图 9.16　E2F1 介导的凋亡诱导　细胞凋亡的时期可以通过荧光激活细胞分选（FACS）的方法监测，此图中通过这个方法来测量单个细胞或者亚细胞碎片的大小（横坐标），以及给定大小的细胞数（纵坐标）。在这个实验中，E2F1 转录因子（E2F，绿色）与雌激素受体（ER）蛋白（红色）融合，使得 E2F1 的活性依靠于它莫西芬（OHT），一个雌激素受体的配基。在没有它莫西芬的情况下（上格），E2F1 因子存在于细胞质中，此时大多数的细胞都在大约 100 个单位的群中（2.44%的细胞更小一些）。但是，当它莫西芬加入细胞中后（下格，紫色球形），NLS 被暴露出来，含有 E2F1 的融合蛋白被转运进细胞核中并被激活，导致大量基因的表达，包括一些有凋亡作用的基因。结果，明显有一部分细胞（32.06%）比正常细胞要小，表示它们在凋亡过程中被碎片化。（From T. Hershko and D. Ginsberg，J. Biol. Chem. 279：8627-8634. 2004.）

这条通路与上面提到的非 p53 依赖的凋亡信号一起完成了清除那些缺乏正常 pRb 功能的细胞。这种 E2F 起始的凋亡似乎可以解释失去了 *Rb* 基因两个拷贝的小鼠胚胎为什么在妊娠中期会因为过度增殖以及并发的某些关键细胞类型凋亡，包括参与红细胞生成和胎盘功能的细胞的死亡。

ARF 调控 p53 功能的重要作用说明了在肿瘤形成过程中 ARF 功能可能由于许多不同的分子机制而丧失。这种丧失可能赋予肿瘤细胞与 *p53* 基因本身突变同样的后果。实际上，$p14^{ARF}$ 基因转录的调控是非常复杂的并且因此非常容易受到许多改变的影响（补充材料 7 ◎）。

总体来说，细胞因为丧失了 pRb 的控制而对周围的组织形成威胁，从而当 E2F1 失控时会启动凋亡。E2F1 和凋亡间的这种联系可以推理出一个观点，即缺失了 pRb 的大多数细胞一般都不会形成肿瘤发生前的克隆，因为这些细胞一旦损失了这个重要的调控机制就会凋亡。

根据这个逻辑，它与 *E1A* 和 *myc* 癌基因的某些特性相似，都由 pRb 调控失活而且都是高效地引发凋亡。而且腺病毒 E1A 癌蛋白与 pRb 结合并高效地隔离它和它的亲缘

蛋白质。Myc 蛋白则是拉住细胞周期时钟的调控杆以保证 pRb 通过磷酸化而失活（8.5 节和 8.9 节）。

许多关于 *myc* 癌基因的功能研究表明，此基因同时具有有效的促有丝分裂以及促进凋亡的功能。实际上，*myc* 癌基因有着很强的促进凋亡效应以至于大多数偶然获得 *myc* 基因的细胞都很快地通过凋亡而被去除。偶尔，凋亡程序可能发生迟缓或者失活，只有这种情况下 *myc* 的促有丝分裂能力才变得明显。

例如，当 *myc* 癌基因在小鼠的淋巴组织中被激活，它立刻引起细胞的快速增殖。但是，细胞的数量并没有实际的增加，因为新形成的细胞很快就凋亡了。如果一个带有 *myc* 癌基因的细胞随后又发生了 *p53* 基因的失活，*myc* 诱导的凋亡将减少，而由它引起的突变的淋巴细胞群将大量增殖。由于可能存在上述相同的通路，在仅带有 $p19^{ARF}$ 基因的小鼠中也有类似的效应（图 9.15C）。

这些讨论说明 E2F 诱导的凋亡仅仅行使了一个抗肿瘤的机制，清除那些不需要的，形成肿瘤前的细胞。但是，对于遗传学改变的小鼠的研究提供了这样的证据，即正常的生理机制也需要依赖 E2F 诱导的凋亡来清除那些在正常免疫系统发育过程中不必要的细胞（补充材料 8 ◎）。

9.9 p53 作为一个转录因子来阻挡 DNA 损伤后细胞周期进程以及参与修复过程

p53 蛋白有一个 DNA 结合结构域（图 9.12A），对于含有随机重复两次的 Pu-Pu-Pu-C-A/t-T/a- G-Py-Py-Py 序列的基序有亲和性的结合（Pu 代表嘌呤核苷酸 A 或者 G，而 Py 则代表嘧啶核苷酸 C 或者 T；A/t 代表一个 A 出现的频率比 T 高的位点；而 T/a 则代表了 T 出现的频率比 A 高的位点）。随机序列中 0～13 号核苷酸将这两个一前一后串联在一起的识别序列分开。这个序列在许多表达被诱导（或者抑制）的下游靶基因启动子或者起始内含子中被发现。

实际上，p53 四聚体的转录激活能力不仅仅依赖于简单地识别并结合含有这个序列的启动子。p53 必须经过复杂的共价修饰，多在 C 端结构域，包括乙酰化、糖基化、磷酸化、核糖基化以及 sumo 化（包括分别和乙酰、糖基、磷酸、核糖以及 sumo 结合，后者是类似于泛素的多肽，可以标记蛋白将其定位到特殊的细胞位置，通常在核内，图 9.35）。这些修饰似乎可以影响 p53 与其他转录因子的相互作用从而调整它的转录功能。实际上，p53 与其他这些转录因子的组合作用决定了由 p53 激活的众多靶基因中特定的一个。

正如图 9.6B 中所示，绝大多数（>90%）在人类肿瘤细胞基因组中发现的 p53 突变等位基因编码在 DNA 结合结构域中发生了氨基酸替换的蛋白质。这导致了有缺陷的 p53 蛋白，不能与下游靶基因的启动子结合，因此失去了即使不是全部至少也是大部分的 p53 功能。

前面介绍过，p53 转录因子一个非常重要的靶基因就是 *Mdm2* 基因。当作为一个转录因子激活时，p53 促进了 Mdm2 的合成，而 Mdm2 则能促进 p53 的降解（图 9.11）。这形成了负反馈环以保证 p53 分子在合成后能很快降解，使正常细胞中的 p53 蛋白保持

在较低的水平。

p53-Mdm2 反馈环解释了 p53 异乎寻常的行为。在带有突变或有缺陷的 *p53* 等位基因的人类肿瘤细胞中，p53 蛋白相对于正常细胞来说其水平几乎是保持在高浓度不变（见图 9.17）。简单看来，这似乎很奇怪，因为一个像 p53 这样的生长抑制蛋白在如此高的水平似乎与恶性细胞的增殖相矛盾。

这个自相矛盾的现象可以被上面提到的事实解释，即大多数突变的 *p53* 基因导致 p53 蛋白丧失其转录激活能力。一个直接的后果就是 p53 不能诱导 Mdm2 的转录及合成。在 Mdm2 缺失的情况下，p53 可以逃脱降解并累积到一个非常高的水平。这说明很多类型的人类肿瘤细胞积累了高浓度的无功能的 p53 分子。

这个推理解释了为什么在肿瘤细胞群中容易检测到 p53。一般通过免疫染色的方法来检测（图 9.17），在这些细胞中存在突变的 *p53* 的等位基因容易引起误解（这个结论还不能轻易得出，但是，通过分析刚被电离辐射处理过的人类组织，这些电离辐射也能在几天内甚至照射后的几周后引起 p53 的广泛表达）。这个推理解释了在 SV40 感染或者转化的细胞中 p53 蛋白含量较高的原因：p53 被病毒的大 T 抗原隔离，抑制了 p53 诱导的 *Mdm2* 基因的表达，从而抑制了 p53 的降解。

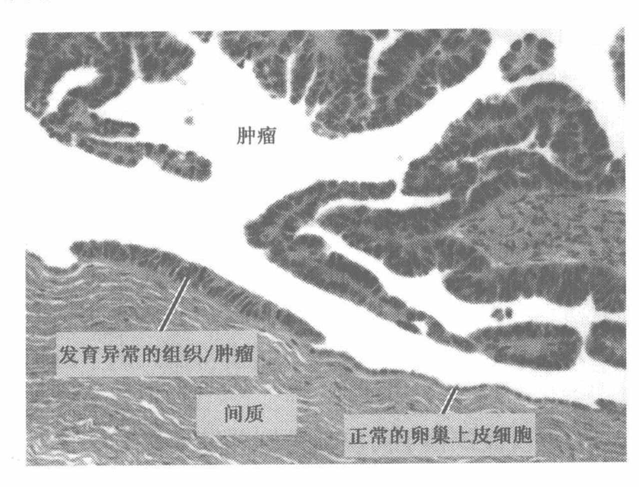


图 9.17　*p53* 突变细胞中 p53 的积累　这个在显微镜下的视野显示的是卵巢癌组织，用和过氧化物酶偶联的抗 p53 抗体染色后细胞核被染成黑色。卵巢癌中大量的上皮细胞（上）由含有高水平的 p53 组成；一小块发育异常的组织（左中）也是 p53 阳性的。间质细胞（小的黑色细胞核，粉红色基质，下）是未染色的，正常的卵巢上皮细胞（OSE，下，右）同样也未染色。(Courtesy of R. Drapkin and D. M. Livingston.)

Mdm2 仅仅是由 p53 诱导表达的大量基因中的一个（表 9.2)。前面的讨论中曾涉及过，另外一个非常重要的靶基因就是 $p21^{Cip1}$（在小鼠中有时被称为 *Cdknla*)，我们曾经在 8.4 节提到过，它是一种广泛的 CDK 抑制剂。它的诱导表达解释了 p53 细胞的生长抑制（而不是促进凋亡）活性。实际上，编码 $\mathrm{p21^{Cip1}}$ 蛋白的基因最早就是在专为寻找 p53 诱导的基因而设计的实验中被发现的。在被发现后不久，就研究清楚了 $\mathrm{p21^{Cip1}}$ 起到一个细胞周期依赖激酶（CDK）抑制剂的重要作用。因此，$\mathrm{p21^{Cip1}}$ 抑制两个 CDK，在细胞周期的 G_1、S、G_2 和 M 期晚期发挥作用的 CDK2 和 CDC2 就能解释 p53 是如何阻断细胞周期各个时间点向前进展的。

表 9.2　依据功能分类的 p53 靶基因举例

基因类型	基因名称	基因产物功能
p53 拮抗剂	*MDM2/HDM2*	诱导 p53 的泛素化
生长阻滞基因	$p21^{Cip1}$	CDK 抑制剂、DNA 聚合酶

续表

基因类型	基因名称	基因产物功能
	Siah-1	β-catenin 降解
	14-3-3σ	将 cyclin B-CDC2 束缚于细胞质中
	Reprimo	G_2 期阻滞
DNA 修复基因	*p53R2*	核苷酸还原酶——DNA 前体的合成
	XPE/DDB2	global NER
	XPC	global NER
	XPG	global NER、TCR
	GADD45	global NER?
	DNA pol κ	易出错的 DNA 聚合酶
凋亡调节子	*BAX*	线粒体孔蛋白
	PUMA	BH3 线粒体孔蛋白
	NOXA	BH3 线粒体孔蛋白
	p53AIP1	去除线粒体膜电位
	Killer/DR5	细胞表面死亡受体
	PIDD	死亡结构域蛋白
	PERP	促凋亡转膜蛋白
	APAF1	caspase-9 的激活子
	NF-κB	转录因子参与 TNF 信号通路
	Fas/APO1	死亡受体
	PIG3	线粒体氧化/还原调控
	PTEN	降低抗凋亡的 PIP3 水平
	Bcl-2	（抑制）其表达
	IGF-1R	（抑制）其表达
	IGFBP-3	IGF-1
抗拮抗蛋白	*TSP-1*（thrombospondin）	血管生成拮抗剂

如无特别说明，此表格中的基因表达都是由 p53 诱导的。

这个资料也为我们揭示了 p53 在细胞生命中扮演的生理功能。例如，如果某个细胞的染色体 DNA 在细胞周期的 G_1 期受到某些损伤，p53 将被激活，同时通过浓度的快速增加和能使其作为转录因子发挥作用的翻译后修饰，然后 p53 将诱导 $p21^{Cip1}$ 的合成，而 $p21^{Cip1}$ 将阻止细胞的进一步增殖。

同时，细胞内的 DNA 修复机器也将被动员起来对损伤进行修复。其中有些是直接被 p53 诱导的。有研究表明，在带有野生型 p53 等位基因的细胞中某些 DNA 修复蛋白要比在带有突变 *p53* 等位基因的细胞中能更快地动员起来。例如，缺少功能型 p53 的细胞不能有效地对由苯并芘（存在于焦油中的一种致癌物）引起的 DNA 损伤，以及由紫外线辐射引起的环丁烷嘧啶二聚体进行修复。另外，DNA 聚合酶 β 在重建 DNA 链的过程中发挥着重要的作用，它的功能被 DNA 修复蛋白影响，它的活性在没有 p53 的细胞中与野生型的对照相比要低得多（见表 9.2）。我们将在第 12 章讨论这些 DNA 修复蛋白以及它们的机制。

当 DNA 被成功修复后，保护 p53 不被降解的信号将消失。接下来 p53 水平降低而 $p21^{Cip1}$ 水平则恢复正常。这使得细胞周期进程恢复，保证细胞进入 S 期，DNA 的复制得以开始。

这一系列过程的原理很简单：通过将细胞周期进程阻滞在 G_1 期，p53 阻止细胞进入 S 期对未修复的 DNA 进行复制。如果这样的复制发生了，会将突变的 DNA 序列传到一个或两个子细胞中。$p21^{Cip1}$ 在细胞生长抑制活动中的重要性可以通过两个 $p21^{Cip1}$ 基因拷贝都失活的遗传型改变的小鼠来说明。虽然不像 p53 缺失小鼠那样的肿瘤易感性，但这些小鼠在后来也有着很高的肿瘤发病率。这个缓和表型正是我们所期望的，因为 $p21^{Cip1}$ 介导了一部分而不是全部的 p53 的肿瘤抑制活性。

如果一个受到 DNA 损伤的细胞已经进入 S 期，在复制 DNA 的时候，由 p53 诱导的 $p21^{Cip1}$ 会在复制叉处连接 DNA 聚合酶机器并阻挡其沿着 DNA 模板的行进（它通过抑制 DNA 聚合酶核心部分的活性而发挥功能）。这里仍旧是以在 DNA 被成功修复前停止 DNA 的复制为目的。

p53 蛋白通过其他的基因和蛋白质来增强对细胞周期的阻滞。例如，Siah——另一个 p53 诱导的基因产物，参与 β-catenin 的降解；而 β-catenin 则帮助诱导 cyclin D1 的合成以通过细胞周期的 G_1 期（8.3 节）。β-catenin 的丢失可能会引起 *myc* 基因转录的降低，除了对 G_1 期进程的影响也会引起其他细胞周期各个时期的进程减慢（8.9 节）。

其他两个由 p53 激活的基因编码了 14-3-3σ 和 Reprimo 蛋白（见表 9.2），能帮助管理 G_2/M 的转换。14-3-3σ 蛋白将 cyclin B-CDC2 复合体隔离在细胞质中并阻止其入核，而 cyclin B-CDC2 必须在核内才能发挥其促进有丝分裂的功能。这个机制使有丝分裂停止指导染色体 DNA 被成功修复。

p53 的这些功能使得有人将之称为“基因组的保护神”。在染色体 DNA 受损伤之后通过阻止细胞周期的进程和 DNA 的复制以及通过诱导表达 DNA 修复酶，p53 能够减少细胞基因组中突变累积的比率。相反，如果失去了 p53 的功能，细胞将复制损伤的未被修复的 DNA，这将导致它们产生带有相对不稳定的基因组，即在细胞增殖中积累了异常高比率突变的基因组。当严重的 DNA 损伤出现时（如影响到一个细胞 DNA 修复功能的损伤），p53 可能会启动凋亡。

在一个很有说服力的实验中，将 $p53^{+/-}$ 的母鼠和公鼠杂交，并用高诱变的致癌剂乙基亚硝基脲（ENU）处理怀孕的母鼠。总共有 168 个后代出生，其中有 70% 的 $p53^{-/-}$ 小鼠（在子宫中受到此致癌剂作用）发生了脑肿瘤，3.6% 的 $p53^{+/-}$ 小鼠也发生，而 $p53^{+/+}$ 小鼠却没有一个发生脑肿瘤的现象。因此，在缺乏 p53 功能的情况下，被 ENU 诱变的胚胎细胞能存活下来并且产生了形成致死性肿瘤的后代。

p53 的缺失导致了基因组中错误的积累，远远不止是由 ENU 引起的点突变。例如，当小鼠成纤维细胞被除去 p53 功能后，它们出现了非常高频率的染色体丢失和重复（至少一部分是由于 G_2/M 期检测点的丢失）并且出现了大量的中间缺失，即在染色体臂中出现的微小片段的缺失。

9.10　p53 常引起凋亡程序

正如这章中很多地方提到的，在某些情况下，p53 能够引起比细胞周期阻滞更为猛烈的反应。在大量不可修复的基因组损伤、缺氧（特别是无氧）或者许多信号失衡的情况下，p53 将会启动凋亡。我们现在将更详细地介绍凋亡程序。

构成凋亡程序的细胞的变化依照着精细协调的计划进行。在几分钟以内，质膜形成**blehs**结构；实际上，随着时间的推移，细胞表面呈现煮沸状（图 9.18A），细胞核断裂固缩（**核固缩**）（图 9.18B），染色体 DNA 片段被裂解成为小的片段（图 9.18C）。然而，细胞中其他部分的变化也能被检测到（图 9.18D 和 E）。最后，通常在 1h 内，凋亡的细胞破碎成小的片段，有时被称为凋亡小体，被组织中邻近的细胞或者路过的巨噬细胞快速摄入，由此消除了不久前还存在的活细胞的所有痕迹（图 9.18F）。许多方法都能在组织或者培养中检测凋亡细胞（补充材料 9 ◎）。

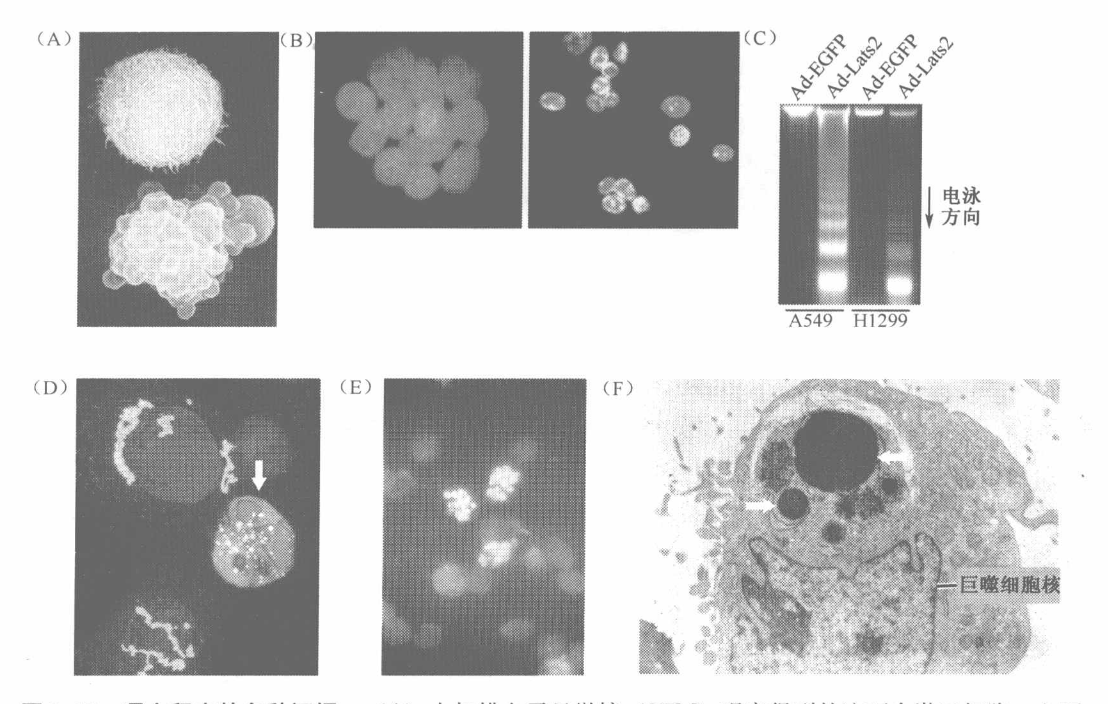


图 9.18 凋亡程序的多种证据 (A) 由扫描电子显微镜 (SEM) 观察得到的这两个淋巴细胞，上面一个是健康的细胞，而下面一个则是进入凋亡的细胞，其表面凸出形成很多水泡样。(B) HeLa 细胞——人类宫颈癌细胞系，融合成为合胞体（左），在融合前，这些细胞中的一部分已经用十字孢碱处理，它是一种凋亡诱导剂。结果这些细胞的细胞核，本来应该很大（左），却开始固缩，伴随着凋亡的进行，它们的染色质凝缩，核结构破坏（右）。很快细胞核便断裂了。(C) 当凋亡被诱导后，此实验中通过表达促进凋亡的 Lats2 蛋白（第二、第四道）、A549 及 H1299 细胞中正常高分子质量大小的 DNA（第一、第三道）被剪切成低分子质量的片段，在凝胶电泳中迁移很快，形成“DNA 梯带”。(D) 高尔基体（绿色）通常在正常细胞（左上）的核周围，而在凋亡细胞（箭头）中，高尔基体则成为碎片。染色质被染成蓝色，而 PARP 在凋亡过程中被剪切的核蛋白则被免疫染为红色。(E) 凋亡程序的广泛影响可以通过使用与组蛋白 2B（染色质中）结合的特异性抗体来显示，组蛋白 2B 上 14 位丝氨酸残基能被磷酸化。此抗体可以对凋亡的细胞核染色（已经发生碎裂）。此位点磷酸化对于染色质的精确作用还需要进一步的阐明。(F) 凋亡的最后结果是凋亡小体——凋亡细胞剩下的片段，被邻近的细胞或者巨噬细胞吞噬。在此图中，被吞噬的凋亡细胞固缩的核片段在上方（白色箭头），而巨噬细胞的正常细胞核则在下方。(A, courtesy of K. G. Murti; B, from K. Andreau et al., J. Cell Sci. 117: 5643-5653, 2004; C, from H. Ke et al., Exp. Cell Res. 298: 329-338, 2004; D, from J. D. Lane et al., J. Cell Biol. 156: 495-509, 2002; E, from W. L. Cheung et al., Cell 113: 507-517, 2003; F, courtesy of G. I. Evan.)

凋亡在正常的形态发生中常被用来去除那些不需要的细胞。它在雕琢的过程中将那些不需要的细胞群凿掉以得到完美的，有功能的组织和器官（图 9.19）。在凋亡机器的主要元件被去除的小鼠中，出现了很多特征性的发育缺陷，包括大脑中过多的神经元、面部畸形、脚趾间蹼化消失的延迟以及上腭与晶状体的异常。

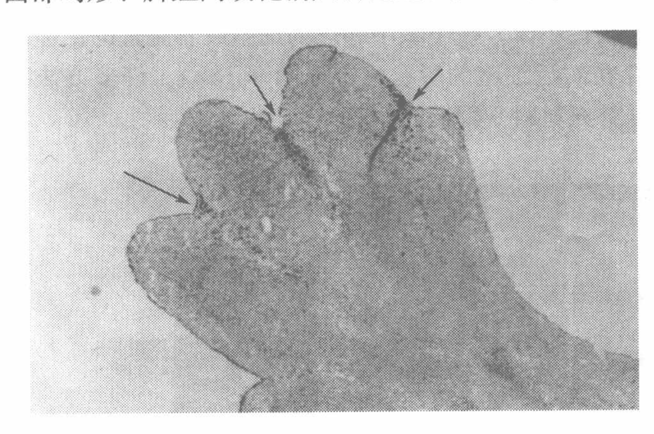


图 9.19　凋亡及正常形态发生　在小鼠的脚掌胚胎中，未来脚趾之间的蹼组织仍旧可通过 TUNEL 检测法标记看到（补充材料图 3B），本图中用黑色小点表示（箭头所示）。形成蹼的细胞的凋亡最终使得由蹼连接的脚趾得以形成。(From Z. Zaker, et al.， Dev. Biol. 165：294-297,1994.)

凋亡在正常组织的生理学中也发挥着重要作用。例如，在小肠中，上皮细胞在 4～5 天的时间内从肠的内褶中来到凸出于肠内的绒毛顶端，通过凋亡而持续被清除（见 7.11 节）。在红细胞发育的过程中（红细胞生成），多于 95％的有核红细胞——成熟红细胞前体，在骨髓中被去除。但是当血液中运输的氧气比率跌到一个阈值时，或者是因为出血或各种类型的缺血或周围空气中低氧压，血液形成激素促红细胞生成素（EPO；信息栏 5.4）将快速上升并且阻断这些红细胞前体的凋亡，使它们成熟成为有功能的红细胞。这使得血液中红细胞浓度快速升高。

另一个生动的例子也能说明凋亡在正常生理学中的作用，即乳腺细胞在子代断奶后的复原。乳腺中的上皮细胞，在怀孕过程中为了给婴儿产生奶水而大量累积，大约 90％的细胞在这个复原过程中通过凋亡而消逝，这个过程常被称为**退化**。

在更普遍的层面上，凋亡是用来保证大量人类组织中的各种不同细胞类型保持在一个合适的数量。这个过程的重要性可以通过一个事实说明，我们的肝脏中新形成的细胞与去除的细胞数量相当，几乎是成年人体内细胞的总数（3×10^{14}）。绝大多数这种消失的细胞都是通过凋亡来去除的。

这种负责常规组织的凋亡似乎并不依赖于 p53 功能而是由其他我们稍后会介绍的机制来启动。因此 p53 的活性似乎仅限于非常规的，即威胁到细胞以及组织的紧急情况。正如前面提到的在肿瘤的特殊发病机制中，p53 启动的凋亡是生物体清除那些有潜在成瘤能力细胞的一种方法，包括那些获得了生长抑制解除突变或者基因组受到广泛损伤的细胞。

p53 起始的凋亡一部分是通过启动许多组成凋亡机器的下游靶基因的表达。这些基因编码了不同类型的凋亡前体蛋白（见表 9.2）。同时，p53 还抑制了那些抗凋亡蛋白的表达。我们将在 9.13 部分了解凋亡程序的生物学细节以及它们与肿瘤发病机制的关系。

总之，这里介绍的多个研究结果表明 p53 的生物学活性可以被分为两大类。在某些

情况下，p53 行使其细胞生长抑制功能，阻碍细胞周期的进程。在另一些情况下，p53 激活细胞潜在的凋亡机制，并由此确保细胞死亡。这两种调控模型间的选择似乎依赖于生理性刺激或者遗传学损伤的种类、刺激或者损伤的严重程度、细胞类型以及细胞中其他促进凋亡或者抗凋亡信号的运作。在生化水平上，p53 是如何在阻碍细胞周期和启动凋亡之间选择还不太清楚。

9.11 p53 失活对初始癌细胞在肿瘤进行发展的多个阶段都起着重要的作用

在第 11 章我们即将学到，人类恶性肿瘤细胞的形成需历经至少 6 个以上的不同阶段，因此常需多年的时间。在肿瘤细胞形成的早期阶段，原癌基因常通过不同形式的突变发生活化。这种活化很容易导致细胞处于 p53 诱导凋亡的危险状态。举例来说，*myc* 癌基因自身即可诱导 p53 依赖的凋亡。因此，具有这样一个癌基因的细胞如果减弱 p53 功能就能具备更强的生长优势。

接下来在肿瘤的发展过程中，越来越多的肿瘤细胞会面临着缺氧的问题，因为它们缺乏一个足够庞大的血管网络提供给充足的血液供氧。在这种缺氧的情况下，正常细胞常会死亡，而肿瘤细胞则会生长下来，这是因为它们的祖辈细胞在肿瘤发生的早期阶段就会失活 *p53* 基因（各因完全不同的原因）。

在进行性肿瘤的多阶段、多步骤的长期过程中，p53 对遗传损伤诱导反应的缺失会允许累积突变高过正常概率的细胞存活下来。这种突变的增多使原癌基因激活和抑癌基因失活相应增多，也会加速前恶性细胞至恶性细胞的演进过程。细胞丢失了 p53 依赖的 DNA 损伤反应带来的后果——端粒断裂，是进化中的前恶性细胞面临的另一大危险（见第 10 章）。

丢失了 p53 功能的初始肿瘤细胞的优势并不仅限于此。依赖 p53 表达的一个重要的靶基因是 *TSP-1*，即凝血酶敏感素 1。在下面的第 13 章我们就会知道，*TSP-1* 是一个在细胞外间隙阻止血管形成的分泌性蛋白。相应的，在肿瘤发展的早期阶段，p53 缺失导致的 *TSP-1* 表达的减少，为成簇的肿瘤细胞得到足够的血供解除了一个重要的障碍。

总之，p53 失活导致的这些各种各样的后果，很好地解释了为什么在正常细胞通常会死亡的情况下，整个警报反应通路系统中的单一成分失灵能使肿瘤细胞获得多种改变而存活。肿瘤细胞得到的这一系列优势也解释了为什么即使不是所有，至少绝大部分肿瘤中 p53 通路都常被破坏。

在几乎过半肿瘤中，p53 蛋白常因 p53 基因可读框突变而被破坏（见图 9.4）。而剩下的其他肿瘤中，ARF 蛋白常会丢失（见补充材料 7 ◎）或有 Mdm2 蛋白过表达。另外，包含了 p53 和它的拮抗物 Mdm2 的复杂信号网络的缺损也会削弱 p53 的功能（见补充材料 10 ◎）。也有理由怀疑，还有许多未发现的遗传机制会颠覆 p53 的功能。总之，整个有机体能因体内众多细胞的 p53 守护神而得到保护，一旦它们中有些细胞 p53 功能缺失，就会使 p53 缺失细胞自由通往恶性转化之路，整个机体就会遭受严重的打击。

9.12 影响 p53 信号通路的遗传突变体等位基因也是肿瘤形成的原因之一

在 1982 年，有许多的家庭被发现对多种不同的肿瘤有着高度的敏感性，这其中包括有：恶性胶质瘤、白血病、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、肾母细胞瘤和软组织肉瘤（图 9.20）。在这些家族中，过半的成员都被上述这些肿瘤所困扰，有 2/3 的家族成员在他们 22 岁之前就有着这些肿瘤的存在。他们之中有些成员甚至同时并发多种肿瘤。

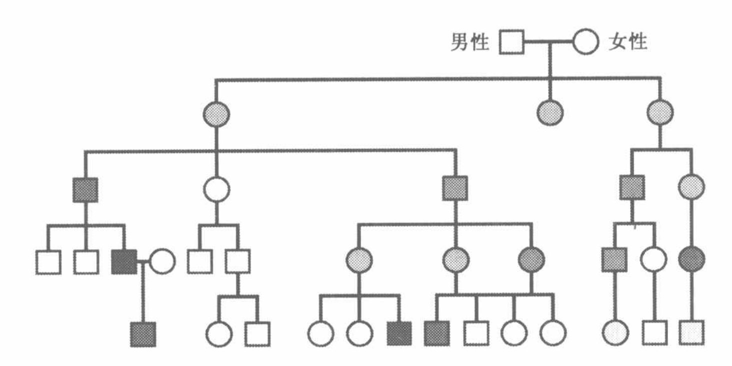


图 9.20 *p53* 等位基因种系突变导致的家族性肿瘤易感性 图中所示患 Li-Fraumeni 综合征的家族系谱揭示了不同肿瘤不断上升的发病率。与大多数的家族性肿瘤综合征单一类型肿瘤发病率增高不同的是这种家族人员发生的肿瘤类别的多样性。此综合征家族人员患有以下恶性肿瘤：乳腺癌（绿色）、恶性胶质瘤（黄色）、白血病（紫色）、肺癌（蓝色）、胰腺癌（橙黄色）、肉瘤（红色）、肾母细胞瘤（棕色）。男性（正方形），女性（圆形）。（From F. P. Li and J. F. Fraumeni，J. Am. Med. Assoc. 247：2692-2694，1982.）

这种家族性的肿瘤综合征叫 Li-Fraumeni 综合征，是被两位人类遗传学家首次发现并认识了解的，它的最特别之处在于能引起多种类型肿瘤的敏感性，这与我们前面第 7 章提到的其他类型的家族性肿瘤综合征相比完全不同。大多数肿瘤抑制基因的等位基因种系突变使得小范围肿瘤类型的敏感性增强（见表 7.1）。

在 1990 年，也就是 Li-Fraumeni 综合征首次被发现后的 8 年，研究者发现大多数病例是由于 17 号染色体短臂的 1 区 3 带，也恰好是 *p53* 基因定位的区域存在等位基因突变。这些肿瘤多发家族的 70%的成员中，*p53* 等位基因突变都遵循着孟德尔遗传法则从母代传至子代。家族成员那些遗传了 *p53* 等位基因突变的个体在生命的早期有更高的可能性发生某种恶变。不同肿瘤发生的年龄也各不相同，例如，5 岁时易发生肾上腺皮质癌；16 岁时易发生肉瘤；25 岁时为脑肿瘤；37 岁时为乳腺癌；50 岁时则为肺癌。因为 p53 在体内发挥的各种抗癌作用，这个基因的遗传种系突变能导致各种类型的恶变也变得非常的合理（也有一些特别的例外，个别的 *p53* 的种系突变仅导致极少的肿瘤类型，见信息栏 9.5）。

信息栏 9.5　*p53* 等位基因突变引起高度特异性肿瘤　有些 *p53* 等位基因种系突变导致的结果与典型的 Li-Fraumeni 综合征家族完全不同。一个罕见的例子在巴西南部被报道过，那里的儿童肾上腺皮质细胞癌（影响肾上腺皮质的功能，肾上腺皮质定位于肾脏内）发生率是世界上其他地方的 10～15 倍，值得注意的是，在检查的 36 人当中，有 35 个人存在着 *p53* 等位基因种系突变，即第 337 位氨基酸残基由精氨酸被组氨酸替换。这个发现与当今普遍认为的 *p53* 等位基因种系突变应该影响体内的多种组织是互相矛盾的。然而，现在认识到 p53 的这种氨基酸替换使得这个突变蛋白的四聚体区域（见图 9.7A）比野生型 p53 欠稳定，特别是对酸性环境敏感，而在肾上腺内的环境却恰恰是酸性的，这也许就解释了这个等位基因种系突变奇怪的组织特异性。

我们知道 *p53* 等位基因突变在 Li-Fraumeni 家族的种系传递意味着分散于 *p53* 可读框的多种点突变，已被证实了的在肿瘤基因组中 15 000 个突变体等位基因的分布也说明了这点（见图 9.6B）。分析种系突变谱就可以发现 CpG 位点的 G：C 向 A：T 的转换。只要 5-甲基胞嘧啶发生自发脱氨基作用，从而被胸腺嘧啶脱氧核苷所取代，这种转换就可能会发生。

有意思的是，另一非常类似于 Li-Fraumeni 综合征的家族性肿瘤综合征群即缺陷型 Chk2 激酶的遗传突变，Chk2 激酶能磷酸化 p53，保护它免于破坏，因而能活化 p53 警报系统（见图 9.13）。*Chk2* 基因的等位基因种系突变在西方人群的发生率是 1.1%～1.4%，在乳腺癌人群中则高达 5%，这表明了 *Chk2* 的等位基因突变的遗传特性显著地增强了恶变率。另一相关的癌症遗传缺陷综合征则来自于 *MDM2* 基因启动子的改变（补充材料 11 ◎）。

9.13　凋亡是一个依赖线粒体的复杂过程

人们普遍认为凋亡功能的丧失是人类所有恶性细胞的标志之一。然而，直到现在为止，我们对凋亡的认识并不完全，也未能完全公平评判这个自杀程序在肿瘤发病学中的作用。因此，我们现在重新回顾一下凋亡，并展开更深层次的探讨。

我们已经知道 p53 起始的凋亡表明了一个重要的机制，那就是组织可以清除掉那些功能紊乱或不可恢复的损伤细胞。还有重要的一点，也就是我们前面所知道的，凋亡还可以以不依赖 p53 的其他多种信号通路的方式起始。一个典型的例子如图 9.21 所示，细胞对细胞外基质锚定的丧失导致失巢凋亡现象，即一个典型的无 p53 介入的凋亡形式。这也暗示着一个重要的问题，即 p53 仅仅是引起程序性死亡的作用者之一，p53 功能的丧失也仅仅是癌症细胞逃离凋亡的方式之一。

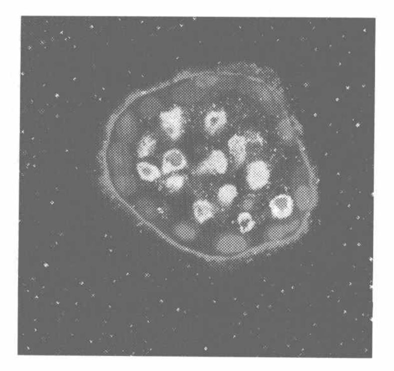


图 9.21　细胞外基质锚定功能的丧失引起失巢凋亡现象　永生化但非致瘤人类乳腺上皮细胞在细胞外基质蛋白培养基中的悬浮使得这些细胞以一种锚定非依赖的方式生长。也就是说，不依赖附着固体底物。这些乳腺上皮细胞（大的蓝色的核表示）成功地通过整联蛋白（红色所示）而附着于周围培养基中的细胞外基质蛋白。这种附着能使这些细胞逃避程序性的细胞死亡也称作失巢凋亡。然而，处于这个球形的细胞克隆群中间的那些细胞因为不能附着于细胞外基质分子而活化失巢凋亡，如补充材料图 3C ◎ 中的实验所示，利用特异性抗体针对参加凋亡的酶（半胱氨酸蛋白酶 3）染色（绿色）表示发生了程序性的细胞死亡。(Courtesy of J. Debnath and J. Brugge.)

最早所知道的其他参与调节凋亡的蛋白来自于对 *bcl-2*（B-cell lymphoma gene-2）癌基因功能的了解。与许多人类造血组织肿瘤基因组中发现的癌症相关基因一样，*bcl-2*基因的致瘤性就是因为染色体的相互易位，也就是 14、18 号染色体臂的一部分发生了交换。在人类滤泡性 B 细胞淋巴瘤细胞已易位的臂上断裂点连接的位置，即是 *bcl-2*基因的可读框在启动子的调控下导致高度的组成型表达的位置所在。

当这样一个 *bcl-2* 原癌基因在保证它在淋巴前体细胞中表达的前提下作为转基因插入到小鼠种系当中，对于转基因小鼠的长期生存并没有什么显著性的影响（图 9.22A，B）。与之不同的是，在这些细胞里表达 *myc* 转基因则会导致淋巴瘤，而且过半的小鼠在它们生后 2 个月就会死亡。然而，如果同时表达这两个转基因（通过 *bcl-2* 转基因小鼠和 *myc* 转基因小鼠育种完成），会导致后代更高的死亡率，所有的小鼠均在出生后 2 个月之内全部死亡（图 9.22B）。

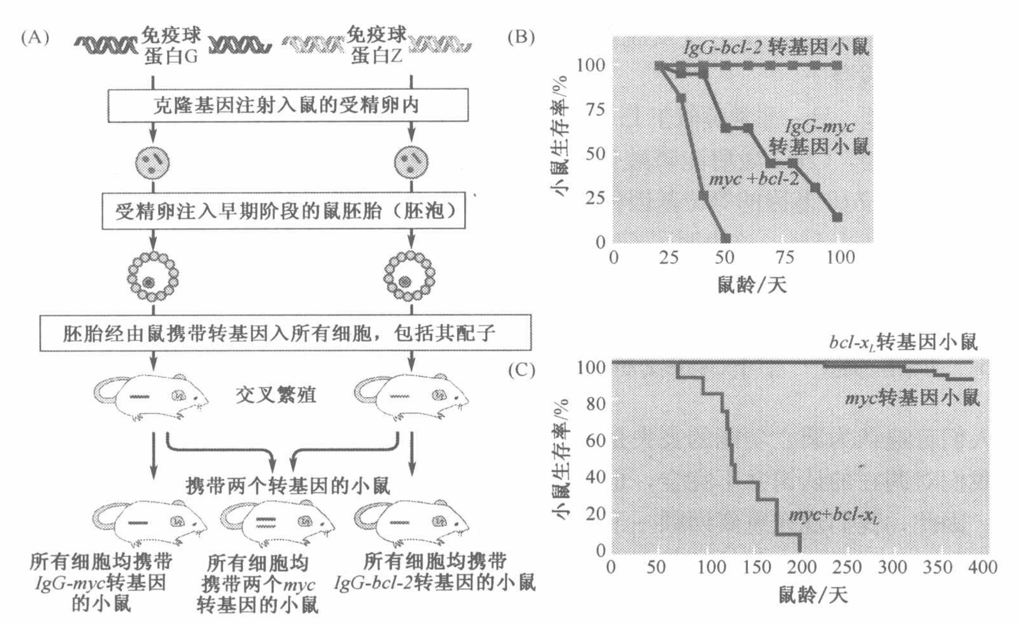


图 9.22 *Bcl-2* 样基因抗凋亡作用 （A）*myc* 和 *bcl-2* 基因克隆建立，每个基因都受抗体基因启动子（IgG）调控。保证两个基因均在 B 淋巴细胞系中特异性表达。然后，两基因均被导入相同种属小鼠，从而两系小鼠都带有转基因。（B）*IgG-bcl-2* 转基因小鼠死亡率没有上升（绿色方形），相反，*myc* 转基因小鼠淋巴瘤死亡率明显上升，在 100 天龄的时候几乎所有的小鼠都死于淋巴瘤（红色方形）。然而，如果 *myc* 和 *bcl-2* 转基因同时存在，淋巴瘤的生成明显加快，在 50 天龄的时候所有的小鼠都不能幸免于难（蓝色方形）。（C）数年以后，有更惊人的结果发现，在免疫系统中的浆细胞（抗体分泌性的）淋巴细胞特异表达 *myc* 或 *bcl-x_L*（*bcl-x_L* 是 *bcl-2* 的近亲系，功能类似于 *bcl-2*）的两个转基因种系，只携带 *bcl-x_L* 转基因的正常小鼠和转基因小鼠都存活超过一年，且没有肿瘤的形成（绿色连线）。相似的，大部分的 *myc* 转基因小鼠在 10 月大时仍然健康，小部分则发生浆细胞肿瘤。然而，当这两系小鼠共同繁殖，双转基因小鼠在 75 天龄时就发生浆细胞肿瘤，在 200 天龄时就全部死亡。（B，from A. Strasser et al.，Nature 348：331-333，1990；C，from W. C. Cheung et al.，J. Clin. Invest. 113：1763-1773，2004.）

bcl-2 自身的这种诱导肿瘤形成的无力与它作为一个癌基因的特性是矛盾的，如 *myc* 癌基因那样释放有效的生长促进信号。通过对 *bcl-2* 转基因鼠中的淋巴细胞的认真研究，发现 *bcl-2* 在细胞内的作用与 *myc* 或 *ras* 确实完全不同。*bcl-2* 能延长本来会迅速死亡的淋巴细胞的寿命。当这些转基因小鼠中的 B 淋巴细胞在体外培养时，它们的生存期明显的得到延长。但在体内，很明显的，那些 *bcl-2* 表达量超过正常细胞很多倍的淋巴细胞却没有活跃增殖，解释了小鼠之所以没有造血组织肿瘤是因为仅仅携带了 *bcl-2*转基因。

myc 癌基因，单独作用时是一个有效的促细胞分裂剂，但它的生长刺激能力却被它的死亡诱导能力所减弱，这个我们在本章的前面提到过（9.7 节）。然而，*myc* 和 *bcl-2* 若同时作用，能使 B 淋巴细胞具备更强的恶性行为。因为 *myc* 能快速增殖细胞，而它的死亡诱导作用又能被 *bcl-2* 的生命延长作用所中和。自从早期的这些实验以来，越来越多的证据强有力地证明 *myc* 和 *bcl-2* 样癌基因的增效效应（图 9.22C）（这就像我们在 9.7 节和 9.8 节中所讨论的，*myc* 的死亡诱导作用能被 *p53* 基因的失活而中和）。

有关 *bcl-2* 的研究逐渐集中到了凋亡。尽管 19 世纪的组织学家认识到了凋亡是动物组织中的一个普遍的生物学现象，但是在 1972 年，它又被重新发现和深入探讨。而在这之前，多细胞动物组织里的细胞通常被认为是因坏死而单个消灭的。实际上，如表 9.3 所示，这两个过程其实是完全不同的。到了 20 世纪 80 年代晚期，对线虫（秀丽隐杆线虫类）发育的遗传学研究揭示了凋亡在这些微小动物正常发育过程参与清除各种细胞（见图 10.1）。这样大家逐渐认识到，对于所有的多细胞生物而言，凋亡都是一个基本的生物学行为。

表 9.3　凋亡与坏死的区别

	凋亡	坏死
强烈刺激来源	程序性组织重塑	代谢压力
	细胞池大小的维持	营养缺乏
	基因组损伤	pH、体温改变
	代谢紊乱	低氧、缺氧
	低氧	
	信号通路失衡	
形态改变		
影响细胞	单个细胞	成群细胞
细胞体积	减小	增加
染色质	凝聚	断裂
溶酶体	不影响	异常
线粒体	最初形态正常	形态异常
炎症反应	无	明显
细胞命运	凋亡小体被邻近细胞吞噬	裂解
分子改变		
基因活性	需要	不需要
染色体 DNA	特异位点剪切	自由剪切
胞内钙离子	增加	无影响
离子泵	持续作用	消失

改编自 R. J. B. King，Cancer Biology，2nd ed. Harlow，UK：Pearson Education，2000.

一旦凋亡程序开始被人们所认知，Bcl-2 癌蛋白在肿瘤发病学中的作用也变得明朗。与其说它是一种促细胞分裂剂还不如说是一个抗凋亡剂。因此，Bcl-2 以与 p53 完全相反的方式发挥作用。Bcl-2 抑制凋亡，而 p53 则促进凋亡。从遗传学术语角度来说，*Bcl-2* 癌基因激活和 p53 失活对于肿瘤细胞来说起着（一定程度上）相同作用，即都减少凋亡活化的可能性。

无论是生物化学还是细胞生物学方面的研究最后都明确了 Bcl-2 在胞内发挥作用的场所，并出人意料的发现是在线粒体外膜（图 9.23）。刚开始，这个发现并没有被认为有什么意义，因为那时候普遍认为线粒体只特异性的起着一个作用，也就是以 ATP 的方式为细胞提供能量。作为产生能量的副产物，线粒体也被认识到能够参与葡萄糖代谢，从而有利于细胞各种生化过程中的生物合成。

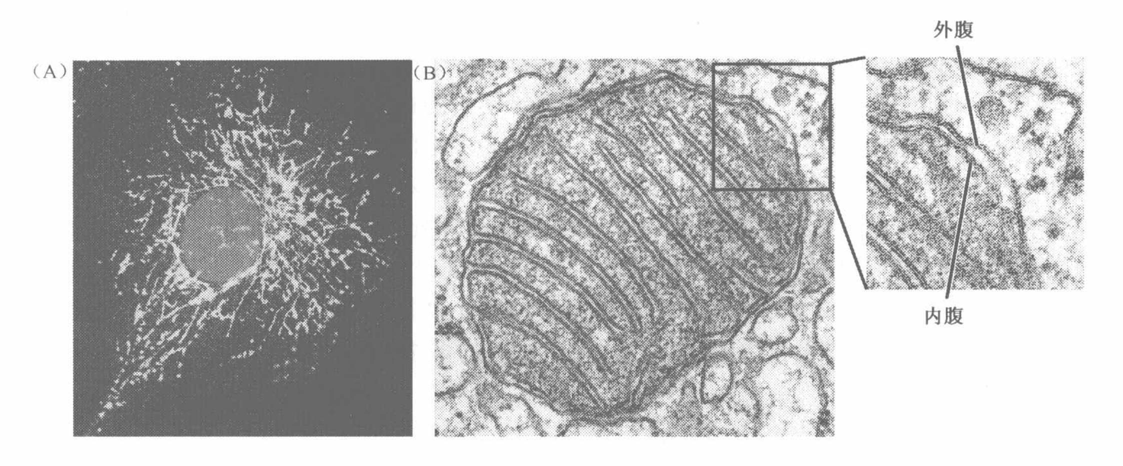


图 9.23　线粒体　(A) 此图中人肝细胞细胞质中的线粒体染为绿色。线粒体曾被认为只是参与氧化磷酸化和某些重要代谢产物的生化合成。自从它们通过释放细胞色素 c 而调节凋亡的作用被发现之后，它们参与细胞生命的作用也被重新估量。(B) 细胞色素 c 通常储存于线粒体内膜和外膜之间的间隙，在电子传递过程中发挥着至关重要的作用。此图未表示出发生凋亡的时候，线粒体外膜上允许细胞色素 c 释放的通道。(A, courtesy of L. B. Chen; B, courtesy of D. S. Friend.)

然而，不久以后，线粒体在凋亡过程中的作用被发现。细胞色素 c 是这个过程的核心因素，通常是位于线粒体内膜和外膜之间的间隙（图 9.22B），作为氧化磷酸化（作用）的一部分起着传递电子的作用。然而，一旦某些信号起始凋亡，线粒体的外膜变得去极化（也就是，失去正常的电压梯度），细胞色素 c 就会脱离线粒体进入外围胞质（图 9.24）。一旦进入胞质，细胞色素 c 就可以联合其他的蛋白质引起导致凋亡的级联事件。所以，在真核细胞进化的过程中，在大量细胞能量产生的地方同时还存在着另一完全不相关的功能，那就是产生和释放生化信使诱导相关变化最终导致细胞死亡。

我们现在知道 Bcl-2 蛋白是一个大而复杂的家族中的一员（图 9.24），它能调控细胞色素 c 通过线粒体外膜上的特异性的通道释放入细胞质。这些通道也特异性的决定细胞色素 c 和其他的蛋白质（一般位于线粒体内膜和外膜间隙）是否从线粒体释放入细胞质。Bcl-2 家族的一些成员，包括 Bcl-2 自身和 Bcl-XL，能够保持这些通道关闭，从而

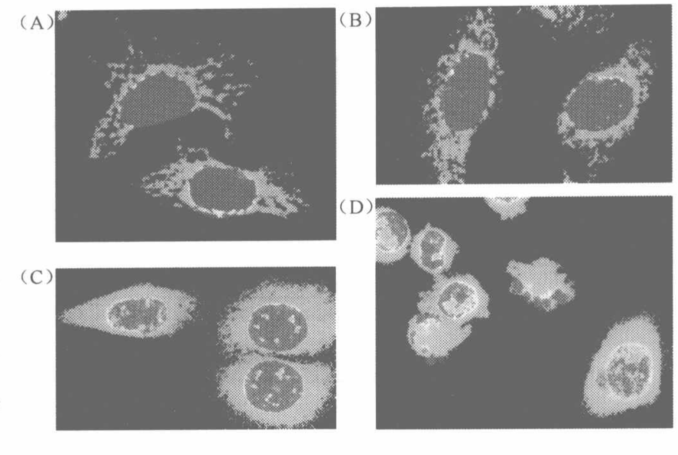


图 9.24 细胞色素 c 从线粒体释放入细胞质 细胞色素 c 可以被特异性荧光标记抗体检测（绿色），与染料标记细胞核区别（橙黄色）。(A) 起始时，细胞色素 c 与线粒体在细胞质中的分布一致，然而如（B、C、D）所示，当凋亡逐渐进展，细胞色素 c 逐渐从线粒体中释放，它在细胞浆中的染色变得越来越均匀一致，同时，胞核表示出与凋亡相一致的断裂（C、D）。（From E. Bossy-Wetzel et al.，EMBO J. 17：37-49，1998.）

使细胞色素 c 仍然保留在线粒体中。

然而其他 Bcl-2 相关蛋白，如 Bax、Bad、Bak 和 Bid（见图 9.25）却是起着开启这些通道的相反作用。例如，其中之一的 Bax，它的编码基因是被 p53 转录激活的，它发挥的作用可以解释 p53 怎样成功地诱导凋亡。Bad 可以被 Akt/PKB 磷酸化，从而减弱 Bad 开启线粒体通道的功能。这也很好地解释了 Akt/PKB 激酶的抗凋亡作用。

当凋亡继续进行，大量 Bax 和 Bak 蛋白的复合物集聚在线粒体的外表面，它们以一种现在我们尚不知道的方式引起线粒体的断裂（图 9.25C）。这样能引起更多的凋亡前体蛋白释放入细胞质，从而使产生 ATP 的主要装置陷入全面崩溃。总而言之，人类基因组已知能编码 24 种 Bcl-2 相关蛋白，它们中的 6 种是抗凋亡蛋白，剩下的 18 种则是凋亡前体蛋白。

每一个通道内的凋亡前体蛋白和抗凋亡蛋白的相对水平决定细胞色素 c 是保留在线粒体内还是释放出来。从这个角度来说，线粒体膜通道决定细胞的生存或死亡。例如，丧失了 Bcl-2 抗凋亡基因生殖系双拷贝的小鼠会导致肾衰和因组织内细胞的大面积死亡引起的免疫崩溃。这种致命性的表型能通过一个叫做 *bim* 的 Bcl-2 凋亡前体近亲基因的单拷贝缺失而避免（图 9.26）。这也可以解释为，在这些组织不同细胞的命运由凋亡前体蛋白和抗凋亡 Bcl-2 样蛋白之间的精密平衡来掌控。

这些论证没有说明为什么哺乳动物细胞表达如此多不同的 Bcl-2 样蛋白。在这个实例中，从研究中得到重要线索提示，各种各样的细胞生理刺激引起 Bcl-2 相关蛋白活化凋亡前体蛋白，从而对抗 Bcl-2 的作用，有利于线粒体外膜的开放而起始凋亡（图 9.27A）。此外，大量的观察发现，但这未能有图解，BH3-only 蛋白（见图 9.25A）的活性能从编码基因的转录、细胞内定位、蛋白水解切割或磷酸化等各个方面调节（图 9.27B）。Bcl-2 蛋白家族的凋亡前体蛋白和抗凋亡蛋白作用各不相同，每个成员都有自己的反相作用伴随者（图 9.27C）。

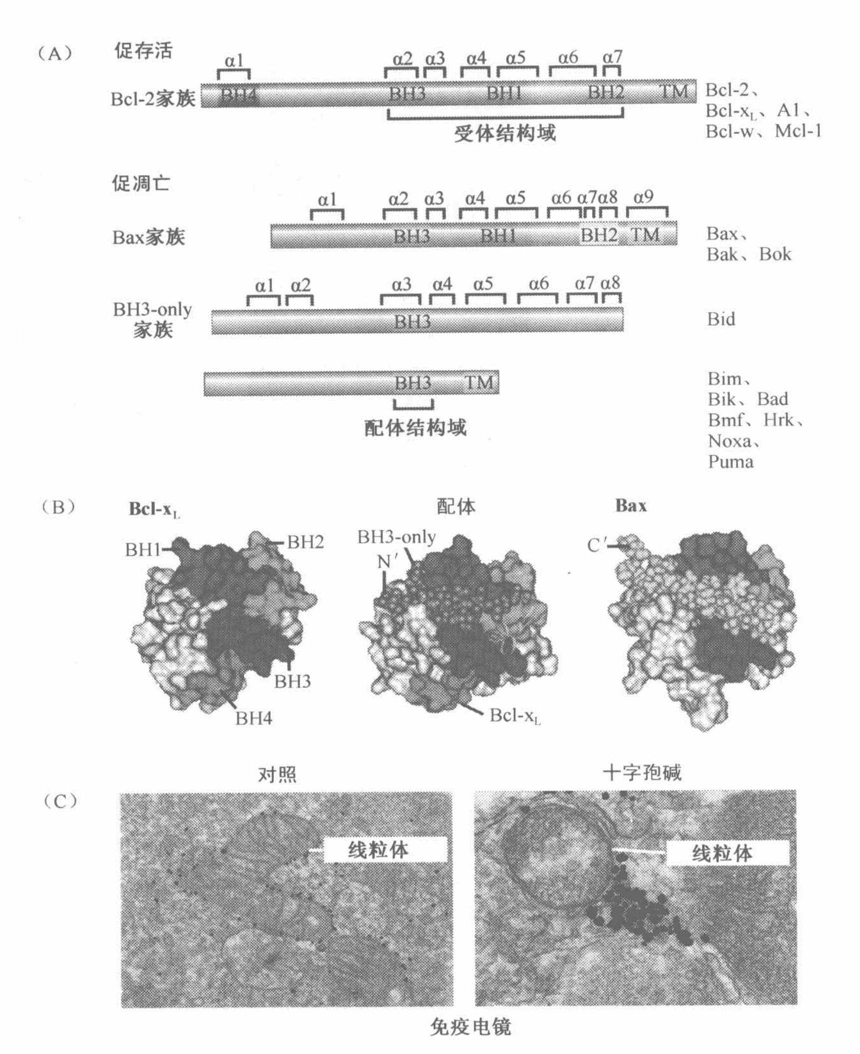


图 9.25 Bcl-2 和相关蛋白 (A) Bcl-2 蛋白是一个大家族成员之一，这个家族成员各自发挥不同的作用抑制凋亡（上）或促进凋亡（下）。这些蛋白都有一个共同的 BH3 结构域（粉红色），其中有些，如 Bcl-2 自身，还有 BH1 和 BH2 结构域（图中所示蓝色、黄色）。有些还有跨膜结构域以利于膜锚定（亮绿）和尚未知功能的 BH4 结构域（棕色），这些凋亡前体蛋白还可以分为亚群，“Bax”家族有着许多和 Bcl-2 结构同源的结构域，“BH3-only”家族只拥有 Bcl-2 中也存在的 BH3 结构域。Bax 家族人员常以无活性方式存在于线粒体外膜或细胞浆中，而 BH3-only 家族的无活性成员常只存在于细胞质。它们都被促凋亡信号活化或易位至线粒体中。(B) 图示 Bcl-x_L 抗凋亡蛋白（左）的 BH1（红）、BH2（碧绿）、BH3（紫色）和 BH4 结构域（绿）。当凋亡前体蛋白 BH3-only 蛋白（黄，中）结合 Bcl-x_L，这个蛋白的 α 螺旋结合到 Bcl-x_L 的 BH1 和 BH3 结构域所形成的沟内，从而抑制 Bcl-x_L 功能。Bax——另一凋亡前体蛋白（右），把自己的 C 端和 α 螺旋尾（黄）卷进相似的沟内（形成一个分子内复合体）（注意它的 N 端至 C 端的方向与上述 BH3-only 蛋白结合到 Bcl-x_L 相反）。这些分子调节线粒体膜通道开放的具体机制有待进一步的探讨。(C) Bax 通常是在细胞质中（不可见），Bak 则可以附着于线粒体外膜（黑斑，左）。通过十字孢碱（STS）处理细胞起始凋亡，数以千计的 Bak 分子（黑斑）就会融合 Bax（不可见）在线粒体表面形成小斑点（右）。这些簇群参与凋亡过程的线粒体断裂，从而有利于细胞色素 c 从线粒体内外膜间隙中的释放。(A and B, from S. Cory and J. M. Adams, Nat. Rev. Cancer 2: 647-656, 2002; C, from A. Nechushtan et al., J. Cell Biol. 153: 1265-1276, 2001.)

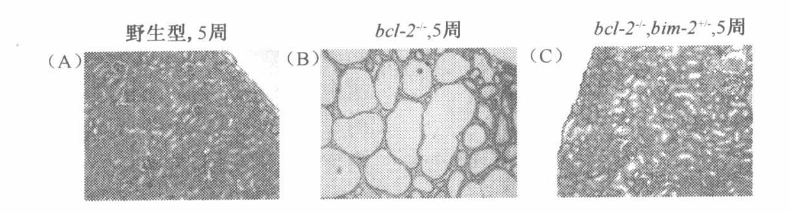


图 9.26 凋亡前体蛋白和抗凋亡蛋白之间的精密平衡 (A) 野生型小鼠的肾脏在 5 周龄时结构完整。(B) 然而抗凋亡 *bcl-2* 基因的双生殖系拷贝缺失（$bcl\text{-}2^{-/-}$ 表型）却导致这个年龄小鼠广泛性的细胞凋亡和多囊性肾病。(C) 如果凋亡前体 *bim* 基因的单生殖系拷贝缺失则可以完全避免这种情况的出现（$bcl\text{-}2^{-/-}$ $bim^{+/-}$ 表型）。(C, from P. Bouillet et al., Dev. Cell 1：645-654，2001.）

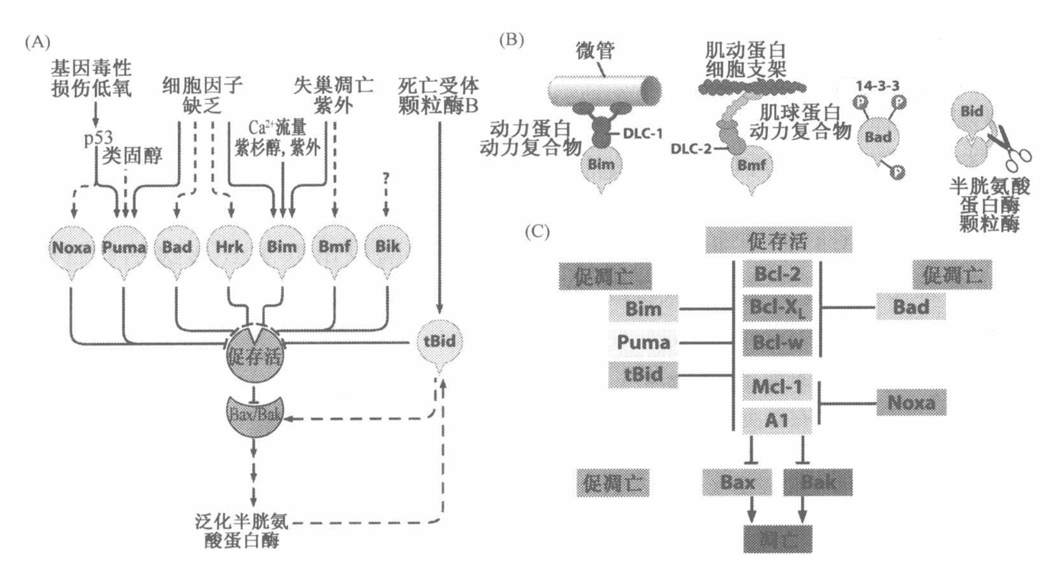


图 9.27 凋亡前体信号通过各种 Bcl-2 相关蛋白作用 (A) Bcl-2 样蛋白的多样性在这里得到充分的说明，各种各样的细胞生理刺激通过不同凋亡前体蛋白去对抗抗凋亡 Bcl-2 蛋白。因此阻止 Bcl-2 蛋白中和 Bax。Bax 是一个重要的凋亡前体蛋白，能从线粒体膜释放细胞色素 c。(B) 活化凋亡前体蛋白 BH3 的多种方式可以部分的从以下方面考虑，它们大都是因为结合各种胞质骨架结构或与一些抑制结构域形成复合物从而维持一种失活的状态。(C) Bcl-2 蛋白家族的每一个成员都有自己的一套反向作用剂。这个网络的中心是抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-x_L、Bcl-w 和 Mcl-1，每个蛋白质都伴随有自己的拮抗物。如 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Bcl-w 就对抗凋亡前体蛋白 Bad。在这个网络系统的最底部，是凋亡前体蛋白 Bax 和 Bak。如果没有拮抗剂，它们就会开启线粒体膜通道从而促进凋亡。图中标明的只是部分 Bcl-2 家族的成员（见图 9.25A）。(A, courtesy of J. Adams; adapted from S. Cory et al., Oncogene 22：8590-8607，2003；B，from S. Cory and J. M. Adams，Nat. Rev. Cancer 2：647-656，2002；C，courtesy of D. Huang.）

细胞色素 c 一旦从线粒体逃逸至细胞质，它就与 Apaf-1 蛋白形成一个复合物结构，称作**凋亡小体**（图 9.28）。形成的这个凋亡小体复合物活化潜在的细胞质蛋白酶前体 caspase 9（半胱天冬酶 9），使之变成活化的 caspase 9。caspase 9 是半胱氨酸天冬氨酰特异性的蛋白酶家族中的一员，编码 11 个这些蛋白酶的基因已经被绘入人类基因组图谱中。

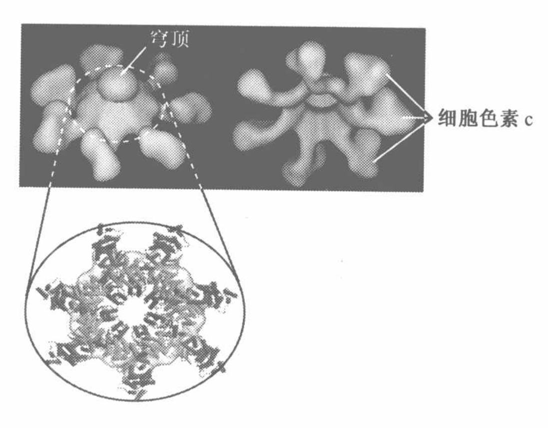


图 9.28　死亡之轮　凋亡小体好比死亡的车轮，是细胞色素 c 分子从线粒体释放到细胞质后在胞质中和 Apaf-1 共同形成。它形成一个 7 个辐条的车轮，Apaf-1 形成辐，细胞色素 c 则形成辐的顶端（上），一旦这种形状形成，前体 caspase 9 就会位于轮的中心（圆顶），这样前体 caspase 9 就会变成活化的 caspase 9。凋亡小体内环的具体结构由 7 个 Apaf 亚基组成，如图中分子模型所示（下）。中间蓝色的单环参与和前体 caspase 9 的反应并使之活化，接着 caspase 9 剪切并活化其他半胱天冬酶，从而激起凋亡级联放大反应。（Top，from D. Acehan et al.，Mol. Cell 9：423-432，2002；Bottom，from S. J. Riedl et al.，Nature 434：926-933，2005.）

被凋亡小体活化后，caspase 9 剪切前体 caspase 3 从而活化另一相关的蛋白酶（见补充材料 3C ◎），接着再切割并活化其他前体 caspase，形成条链式反应（图 9.29）。这种剪切的顺序相连形成一种信号级联放大。这种行为方式如同我们前面所讲过的激酶级联放大反应（6.5 节），也是一组的丝/苏氨酸激酶以串联方式逐级活化（每个 caspase 的催化活化意味着位于级联最上层的相对很小的起始信号能够放大到基底部的大量的活化的 caspase）。

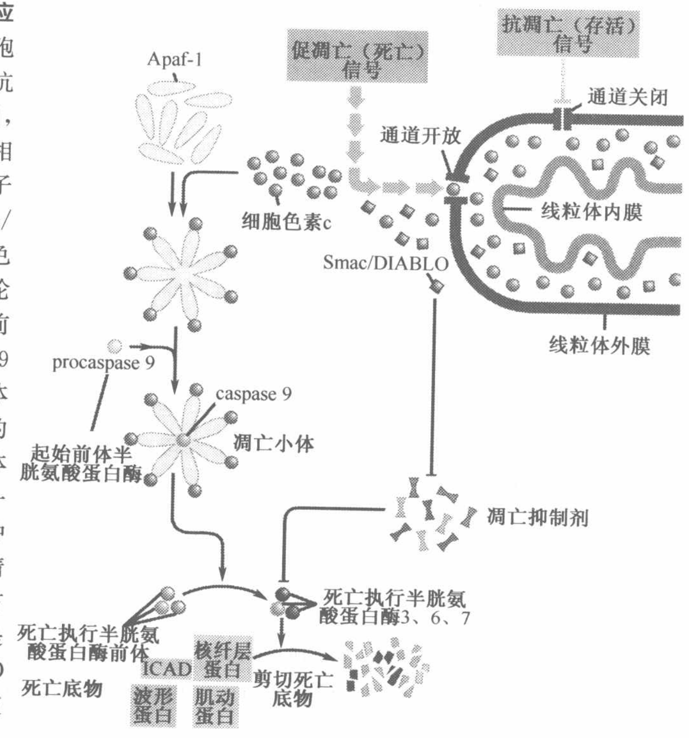


图 9.29　凋亡的半胱天冬酶级联反应　线粒体外膜（暗褐色）有着决定细胞生存或死亡的关键性的门控通道。抗凋亡信号控制线粒体外膜通道关闭，相反，凋亡前体蛋白则使之开启（相互对抗）。释放入细胞质的重要分子是细胞色素 c 分子（红球）和 Smac/DIABLO 分子（褐色方形）。细胞色素 c 聚集 Apaf-1 形成一个 7 辐条的轮状凋亡小体（左），凋亡体能活化前体 caspase 9 成有活性的 caspase 9（绿环），caspase 9 继续活化前体 caspase 3（橙黄环，左）。活化后的 caspase 3 能继续活化其他的前体 caspase（死亡决定性的 caspase），一旦这个活化链形成，就可以剪切各种“死亡底物”，产生凋亡表型。正常情况下，许多的凋亡抑制物（IAP，右下）结合并失活 caspase. 然而，同是从线粒体释放出来的 Smac/DIABLO 能对抗这些 IAP（右），从而使 caspase 免除 IAP 的抑制。

当胞质的细胞色素 c 活化 caspase，另一个与细胞色素 c 一同从线粒体释放出来的蛋白 Smac/DIA- BLO 可以失活一组称作 IAP（inhibitor of apoptosis，见图 9.29）的抗凋亡蛋白。正常情况下，IAP 以下面两种方式抑制 caspase 活性：直接结合从而抑制 caspase 蛋白水解活性（图 9.30）；有些情况下，它们则遍在泛素化 caspase 并随之把它降解。如果没有 IAP，caspase 可以自由起始蛋白水解切割，最终导致凋亡。

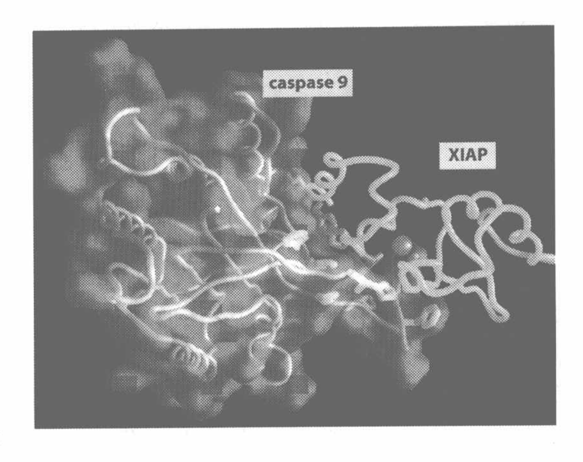


图 9.30 凋亡抑制物的结构 IAP 这个庞大的家族（凋亡抑制物）是靠结合并抑制各种半胱天冬酶分子，从而阻止半胱天冬酶级联反应的活化起始的凋亡。这里所示的是 IAP 家族一个叫 XIAP 分子（绿色）的 BIR3 结构域和 caspase 9（亮蓝）所形成复合物的分子结构（所示为 XIAP 肽链骨架，caspase 9 的肽链骨架和空间结构模型）。这个复合物中心的锌原子用红色显示，XIAP 和 caspase 9 相互作用的重要残基分别为粉红、黄色显示。这种与 XIAP 的结合阻止了 caspase 9 的同源二聚化，而这种二聚化恰是 caspase 9 活性所必需。（From E. N. Shiozaki et al.，Mol. Cell 11：519-527，2003.）

所以，在线粒体膜通道开放以后，凋亡信号以两种方式活化。细胞色素 c 释放并活化凋亡小体内的 caspase 9。同时，从通道内释放出来的 Smac/DIABLO，失活 IAP，从而使 caspase 免除 IAP 的抑制（另外，一个重要的功能蛋白，即 caspase 9 被抗凋亡 Akt/PKB 激酶磷酸化，caspase 9 的磷酸化能抑制它功能的发挥，从而也可以解释 Akt/PKB 的抗凋亡功能）。

caspase 的级联活化将会一直进行，直到最终剪切“死亡底物”，也就是这个死亡底物的降解能导致细胞的程序性死亡（图 9.29）。这些 caspase 各自特异性的作用能使它们从功能上分为两类：一类为起始性的 caspase，即通过活化 caspase 级联反应起始凋亡的发生；另一类为接下来的死亡执行 caspase，它们才是真正的破坏细胞重要组分的实施者。

一系列重要的细胞组分都被这些死亡执行性的 caspase 如 caspase 3、6 和 7 剪切。它们的剪切降解引起细胞复杂的形态学转化，这些转化伴随着细胞的凋亡而进行。核膜内表面的核纤层蛋白的切割即和可观测到的代表凋亡的染色质凝集和核皱缩（固缩）同时进行。剪切半胱天冬酶活化的脱氧核糖核酸酶的抑制剂（ICAD）能使脱氧核糖核酸酶活化，从而降解染色体 DNA。剪切细胞骨架蛋白如肌动蛋白、网格蛋白、弹性蛋白和（肌动蛋白）凝溶胶蛋白能使细胞骨架塌陷，质膜外生性的水泡状生长，形成“自然死亡”小体，也就是残存下来的浓缩的细胞碎片（图 9.18）。

死亡执行 caspase 甚至把它们的作用范围又延伸回到线粒体，也就是凋亡起始的地方。它们的一个重要的底物蛋白是线粒体电子传递链的一部分。caspase 对它的降解能破坏电子传递链，ATP 产生失败，从线粒体释放活性氧，线粒体的结构也失去整体性。凋亡多个步骤的有效实施一定程度上又进一步地增强了凋亡起始信号（信息栏 9.6）。研究者们估计在凋亡的过程中有 400～1000 个蛋白被剪切，但是还不确定它们中到底有

多少正式参与了凋亡的作用，又有多少仅是细胞崩解时的受害者。

信息栏 9.6　凋亡起始信号的扩增能保证凋亡的有效进行　一旦凋亡的半胱天冬酶级联反应开始活化，一些扩大和增强起始步骤的调控机制也会辅助这个决定的执行（这种正反馈有时相应的称作“前馈”）。因此，caspase 3 剪切的一个蛋白是 NF-κB 转录因子的 Rel 亚基。如前所示（6.12 节），这个转录因子是一些重要的抗凋亡基因的活化剂，如 *bcl-2* 通过破坏 NF-κB 一个重要的亚基，caspase 3 就破坏了调节机制的平衡，从而有利于凋亡的发生。更有意思的是，通过禽网状内皮组织增生症反转录病毒作用来源的 Rel（NF-κB 复合物的一个重要的成分）的致癌衍生物，也就是 v-Rel 癌蛋白，在这个反转录病毒基因组的进化过程中，这个病毒致癌基因能通过一个缺失和两个点突变，从而使编码的 v-Rel 癌蛋白抵制 caspase 3 的剪切，这样就能增强抗凋亡能力，提高致癌潜能。

caspase 级联反应是决定凋亡是否发生的主要信号通路，在凋亡起始后，又决定各个死亡诱导步骤如何活化。在发现 E2F1 活性和凋亡的关系后，这些 caspase 的精密调节也引起相当的重视。以前，我们知道 E2F 过度活化能导致细胞 pRb 信号通路的紊乱，也能活化 ARE 编码基因的表达而诱导凋亡。现在，我们也逐渐认识到 E2F，如 E2F1，能够提高许多重要 caspase 基因转录水平 5～15 倍。从它们自身来说，这些增强并没有能引起凋亡，但是，它们能使细胞对凋亡刺激信号的敏感性增强，如 p53 释放的凋亡刺激信号，从而使细胞更倾向于发生凋亡（E2F 也能通过诱导许多 Bcl-2 相关凋亡前体蛋白的表达而使它们的这种促凋亡作用更加的复杂化）。

9.14　细胞凋亡的两条不同的信号通路

前面所述的凋亡程序能在许多信号刺激下被 p53 所起始，这些刺激信号包括了重要的基因组损伤、缺氧，和那些细胞内部生长调节信号的不平衡。总之，一旦 p53 开始活化处于凋亡诱导状态，它可以推动如 *Bax* 这样的蛋白编码基因的表达（表 9.2）。Bax 能开启线粒体膜通道，细胞色素 c 和其他凋亡前体蛋白就能从线粒体释放出来，caspase 活化，起始凋亡。

这一系列的事件有时候称作细胞凋亡的内途径，因为起始信号来自细胞内部。其他还有一些称作应激活化凋亡通路。虽然现在知之不多，但还有其他一些类型的信号可以不依赖于 p53 使线粒体释放细胞色素 c。我们所说的应激事件有：细胞内高钙、高氧、特定的 DNA 损伤和其他一些损伤微管的事件（微管是细胞骨架和有丝分裂纺锤体的重要组分）。各种肿瘤病毒的感染也可以诱导凋亡。有意思的是，这些病毒还会努力阻止细胞的内途径凋亡程序的起始，这样在它们的感染周期完成之前它们的宿主细胞不会死亡（补充材料 12 ◎）。

重要的是，凋亡也可以通过其他选择性的途径起始。其中之一就是细胞外信号活化凋亡前体细胞表面受体。细胞表面受体是跨膜蛋白，通常被称为死亡受体，提示它们能活化凋亡程序的能力（图 9.31）。在结合了细胞外间隙的相应配体后，死亡受体能活化细胞质的半胱天冬酶级联反应，最终和前面所述的内途径凋亡通路会聚，与内途径凋亡通路一样的导致凋亡的发生（图 9.32）。因为活化死亡受体的信号来自细胞外，因此由这种受体所引起的凋亡也叫做外途径凋亡程序或受体活化凋亡途径。

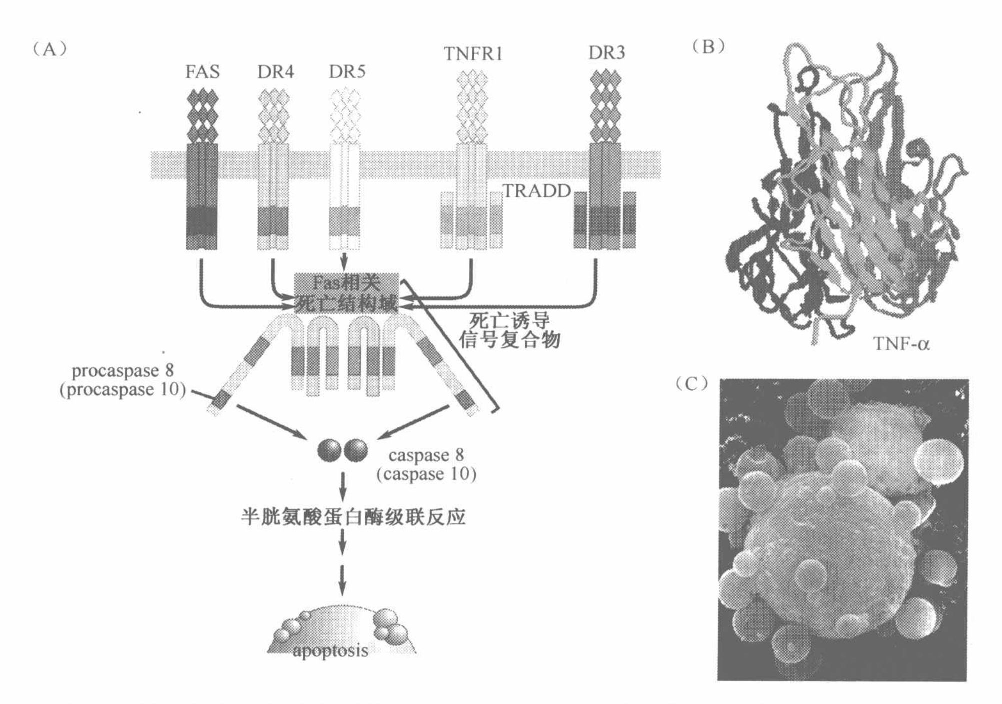


图 9.31　死亡受体　(A) 不同类型哺乳动物细胞表面有 5 个不同"死亡受体家族"，例如，FASL 和 APO2L/TRAIL 配体结合 FAS、DR4 和 DR5 死亡受体（左上）。这些受体的胞质尾部连接 FAS 相关死亡结构域（FADD）形成死亡诱导信号复合物（DISC），后者能把酶原 caspase 8 和 caspase 10 变成它们相应的活化形式，也就是 caspase 8 和 caspase 10。然后和内途径的 caspase 级联反应汇聚。在 TNFR1 和 DR3 受体活化后，也是一个类似的顺序发生事件（右上）。这些死亡受体与受体酪氨酸激酶（配体诱导二聚化）不同，区别在于它们的三亚基配体复合物引起受体三聚化。(B) 这些死亡受体的配体，有时叫做"死亡配体"，都是同型三聚体而且引起它们连接受体的三聚化［可以与生长因子受体的配体比较（图 5.16），它们大部分为同源二聚体］。这里所示是肿瘤坏死因子-α（TNF-α）的分子结构，即 TNF-R1 的配体，每一个单体都用不同颜色标明。(C) 死亡受体的配体，特别是 FasL，常被细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）利用来杀死癌细胞，癌细胞表面通常表达 FAS 受体（CTL 把颗粒酶注入靶细胞。见图 9.31）。在这个彩色的扫描电子显微照相图中，可见一个 CTL（橙黄色）正在攻击一个癌细胞，从细胞表面的多个水泡状突起可知道，细胞正发生凋亡。(A, adapted from A. Ashkenazi, Nat. Rev. Cancer 2：420-430，2002；B，from M. J. Eck and S. R. Sprang, J. Biol. Chem. 264：17595-17605，1989；C，from Andrejs Liepin/Science Photo Library.)

死亡受体的配体是肿瘤坏死因子（TNF）家族成员，包括 TNF-α、TRAIL 和 Fas 配体（FasL）（表 9.4）。TNF-α 因为能引起肿瘤细胞的死亡而首先被发现，后来，这一组蛋白配体因为能引起多种表面表达相应受体的正常细胞死亡也被相继发现。与生长因子和它们的受体相似，每个 TNF 样蛋白，包括 FasL 和 TRAIL/Apo2L，与它们的相应受体结合（图 9.31）。这个受体家族的许多成员，它们之中大约有 30 个由人类基因组编码，有一个共同的胞浆"死亡结构域"。这些受体和它们的行为因为受体和配体名字的多样性变得复杂（表 9.4）。

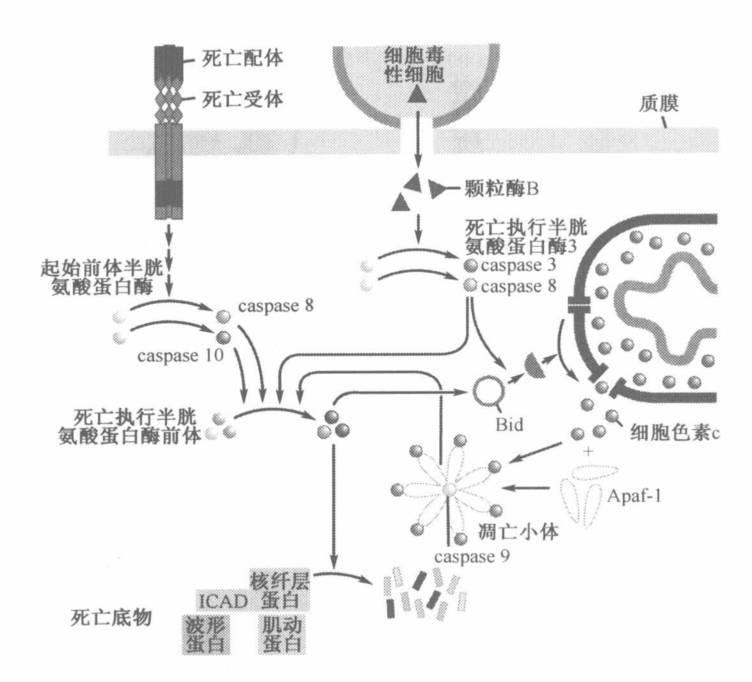


图 9.32 凋亡内途径与外途径汇聚 在死亡受体（图 9.33）把前体 caspase 8 和（或）10 活化成相应的 caspase 后（左上），后者通过切割和活化执行 caspase 和内途径凋亡级联反应汇聚（左中）。另外，在前体 caspase 3 活化成 caspase 3 以后，后者又能切割活化 Bid（见图 9.26B），一个 Bcl-2 相关蛋白（中，红环），Bid 能从胞质转移至线粒体，从而开启线粒体膜通道，形成新的，活化的凋亡小体从而活化凋亡级联反应（右中，右下）。其次，选择性的凋亡外途径以来自免疫系统的细胞毒性细胞（灰，中上）起始，细胞毒性细胞与靶细胞表面相连，产生颗粒酶分子入靶细胞。它们一旦在胞质存在，就能切割并活化前体 caspase 3、8 和 9。

表 9.4 死亡受体和它们的配体

受体名称	配体名称
Fas/APO-1/CD95	FasL/CD95L
TNFR1	TNF-α
DR3/APO-3/SWL-1/TRAMP	APO3L
DR4/TRAIL-R1	APO2L/TRAIL
DR5/TRAIL-R2/KILLER	APO2L/TRAIL

一旦被配体的结合所活化，这些受体的死亡结构域能结合并活化胞质中称作 FADD（Fas-associated death domain protein）的蛋白质。形成的复合物称作 DISC（death- inducing signaling complex），能聚集非活化的，酶原形式的 caspase 8，少数情况下是 caspase 10，它们都是起始性的 caspase。DISC 引起这些 caspase 的自我剪切，变成活化的蛋白酶。caspase 8 和 caspase 10（此条途径的起始 caspase）活化执行死亡的 caspase 3，6 和 7，最后和内途径凋亡程序殊途同归。并且，caspase 3 能切割并活化胞质中叫做 Bid 的 Bcl-2 相关蛋白，Bid 转移到线粒体膜通道并使之开放（见图 9.33）。这样的话，Bid 能通过募集内途径的组分从而增强外途径凋亡程序的信号。

体内有些细胞能利用两条途径启动自身的死亡，而另外一些细胞则只利用二者之一。举例来说，某个细胞可以通过分泌某个表面死亡受体的配体，从而以外途径而启动凋亡，即这个配体以自分泌的方式起始凋亡。细胞到底是采取内途径还是外途径与抗凋亡蛋白如 Bcl-2 的活动有关。因此，在那些活化外途径的细胞中，Bcl-2 的过表达并没起到很大帮助，因为死亡受体以直接启动 caspase 级联反应从而防止线粒体相关的内途径凋亡程序的发生。

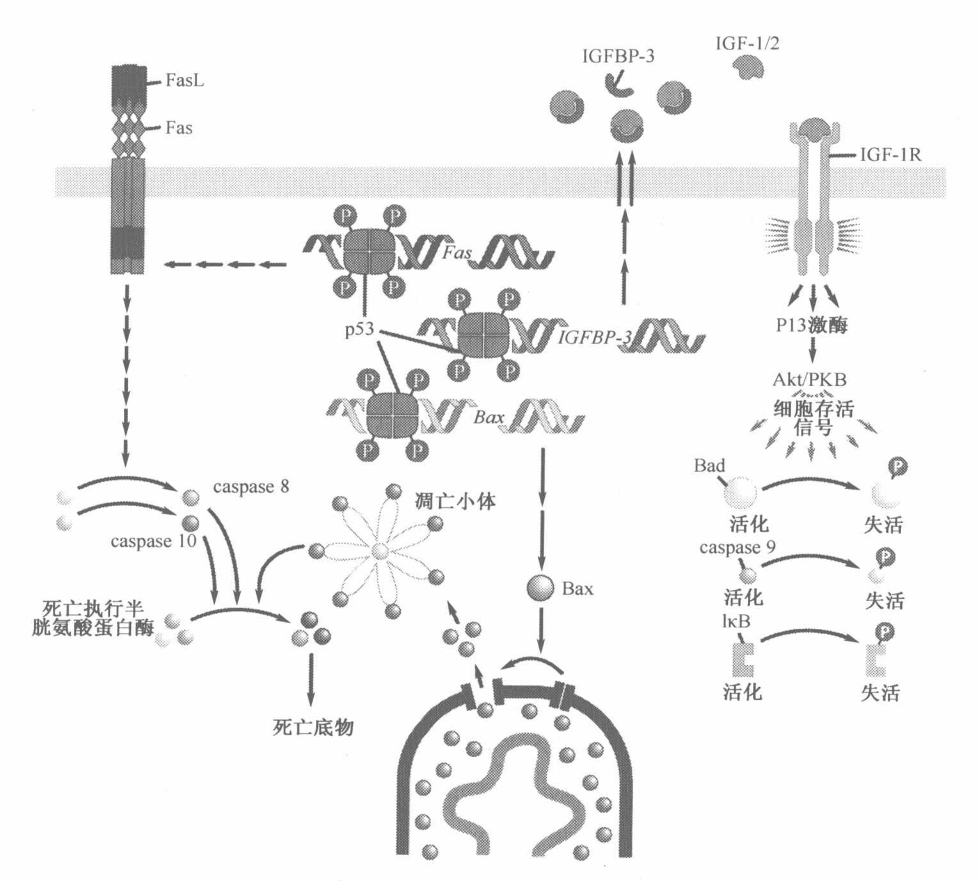


图 9.33 p53 活化凋亡 p53 通过许多的信号通路活化凋亡程序。通过诱导 Fas 受体编码基因的表达，能使细胞表面表达这种死亡受体（褐色，左上）。使细胞对可能存在于细胞外间隙的 Fas 配体（FasL）致敏。通过诱导表达 IGF-结合蛋白 3（IGFBP-3；红），p53 能在细胞外间隙释放这种蛋白，从而结合 IGF-1 和 IGF-2（蓝，中上），也就是 IGF-1 受体的促存活抗凋亡配体（IGF-1 R；右上）。一旦 IGFBP-3 缺失，IGF-1 就会结合受体释放细胞抗凋亡信号，包括那些能导致促凋亡蛋白 Bad（与 Bcl-2 相关）、caspase 9 和 Iκb（对抗 NF-κB）失活的信号。而且，p53 能促进 Box（中）的表达，Box 也是 Bcl-2 相关促凋亡蛋白，能引起细胞色素 c 和其他蛋白从线粒体的释放（中下），p53 还能失活其他许多抗凋亡剂，如 Smac/DIABLO（见图 9.29）。

实际上，还存在着凋亡的第三条途径，其实也是另一条外途径。此途径由杀伤靶细胞的细胞毒素 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞起始。这两种杀伤细胞，也是免疫系统的前线作战者，能够活化靶细胞表面表达的死亡受体如 Fas。另外，杀伤细胞还能结合靶细胞表面一种称作颗粒酶 B 的蛋白酶，颗粒酶一旦受制于这些杀伤细胞，就能切割并活化酶原 caspase 3、8 和 9（见图 9.32）。进行到这一步，这条途径也就和前面所描述的途径相汇聚，继续作用引起凋亡。

上面有关对内、外途径凋亡级联反应的描述使我们对 p53 怎样引起凋亡有了更好的认识（图 9.33）。p53 促进 Bax、Fas 受体和 IGFBP-3 蛋白编码基因的表达（见表 9.2）。Bax 拮抗 Bcl-2 的功能从而开启线粒体膜通道，释放细胞色素 c。Fas 受体一旦在

细胞表面表达，能增强细胞对胞外死亡配体特别是 FasL 的反应敏感性。IGFBP-3 从细胞释放，结合并分解 IGF-1（胰岛素样生长因子-1），这个生长因子能通过自身细胞表面受体产生**营养**（生长）信号。在许多细胞中，这种 IGF-1 产生的生长信号的减少就会使它们处于面临凋亡的危险状态（信息栏 9.7）。

信息栏 9.7　细胞外因子同样有利于细胞存活　从前面所讲我们已经知道癌细胞可以利用胞内信号通路的许多改变减低它们凋亡程序发生的可能性。然而，运用的最多的促凋亡机制包括了在正常组织生理过程中起着重要作用的胞外信号通路。许多正常细胞依赖于对营养（生存）信号的连续暴露，如胰岛素样生长因子 1 和 2（IGF-1、IGF- 2）传递的信号，这样细胞就能保持活力。细胞外环境中如果这些因子水平不够，就会诱导凋亡，即一个被称作“因忽略而死亡”的过程。

许多癌细胞分泌的异常高水平的 IGF-1 和 IGF-2 一旦从癌细胞释放出来，这两个生长因子都会结合和活化 IGF-I 受体（IGF-1R），IGF-I 受体在体内许多细胞都有表达。这种自分泌受体活化后，接着引起胞内抗凋亡信号释放，特别是活化 PI3K-Akt/PKB 通路（图 9.34）。在有些人类肿瘤中已经报道存在着 IGF-2 mRNA 几百倍的过表达，尽管这种程度的高表达并不常见。

另一个较常见的机制就是 IGF 结合蛋白（IGFBP）有效水平的下降，IGF 结合蛋白能通过结合和分解细胞外间隙的活化 IGF 而降低它的有效水平（见图 9.33）（至少有 6 种不同的 IGFBP 已经被认知）。在有些肿瘤中，*IGFBP* 基因启动子的甲基化能减少其表达编码蛋白从而引起癌细胞中此种蛋白的减少。而在其他肿瘤中，癌细胞可能增强有些金属蛋白酶（MMP）的合成和分泌，金属蛋白酶可以切割从而失活周围胞外间隙的 IGFBP 分子。通过降低功能性的 IGFBP 的水平，两种机制都可以引起 IGF 的有效浓度增高，从而有利于癌细胞存活。

我们现在又返回去讨论第 15 章的外途径凋亡程序，因为这个凋亡程序在癌细胞和免疫系统的复杂性相互作用中起着重要的作用。一方面，免疫系统中的细胞能释放死亡配体（如 FasL），诱导目标癌细胞凋亡；另一方面，癌细胞可以表达和释放死亡配体，这样也能杀死那些距离太近，威胁它们生命安全的免疫细胞。

凋亡途径中复杂的信号通路决定是否发生凋亡。这种选择是通过改变促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的平衡最终决定的，也就是决定是否开启这个“细胞凋亡总开关”。

9.15　癌细胞运用多种方法失活部分甚至全部凋亡机制

如前所强调，细胞在形成肿瘤的漫长过程中会遇到许多生理应激因子威胁它们的存在，每个生理应激因子都能诱导凋亡。这些因子包括了缺氧、pRb 通路的下调、*myc* 癌基因的活化和各种形式的 DNA 损伤。这些危险因素解释了为什么大多数甚至所有类型的肿瘤细胞会失活凋亡诱导机制中的重要组分（表 9.5；图 9.34）。我们也可以从有机体整体来审视这些改变，事实上，所有的癌细胞都有抗凋亡的战略机制，这也表明凋亡是存在于正常细胞中的一个阻碍肿瘤形成的重要的抗瘤机制。

在癌细胞中广泛存在的一个抗凋亡机制，也是我们前面已提到过的——p53 通路的失活。*p53* 基因在几乎过半的癌细胞基因组中都有改变，常是通过点突变而导致 *p53* DNA 结合结构域的氨基酸替换。而其他大部分肿瘤中，则存在 ARF 不表达。这通常都是因为编码基因的完全缺失或启动子的甲基化，后者能抑制转录。抑制 ARF 表达的其他机制（如补充材料 7 ◎所述）。小部分人类肿瘤（多为肉瘤）过表达 Mdm2。这些

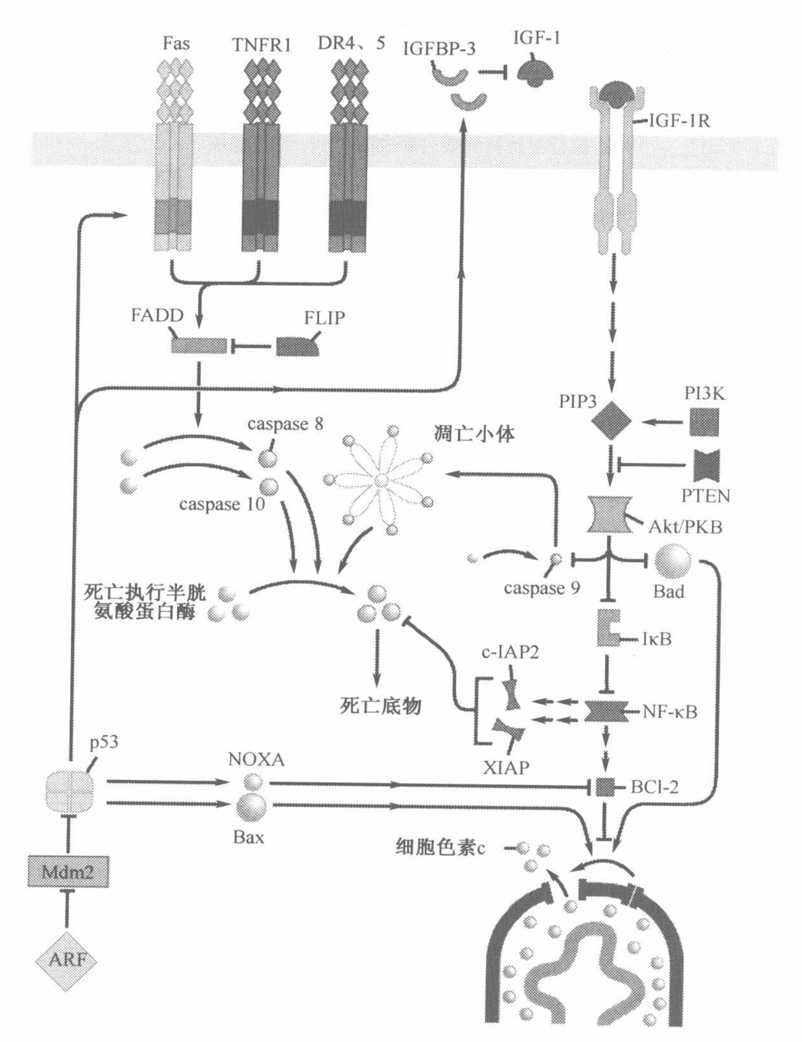


图 9.34 癌细胞抗凋亡机制 癌细胞以各种逃离方式减少凋亡发生的可能性。本图表示了在不同癌细胞中，重要的促凋亡蛋白的表达水平和活性下降（蓝）。相反，某些抗凋亡蛋白的活性和表达水平则有上升（红）（它们中有些是癌细胞中变化了的上游调控者的下游作用物，它们受上游调控者的改变所影响）。

影响 ARF 或 Mdm2 表达的机制都会降低细胞内的 p53 蛋白水平。最终，在许多人类肿瘤细胞中，p53 就会错误定位，沉默于细胞质中，因此也不能发挥它的主要功能——转录激活。

然而，对于许多的人类肿瘤来说，仅仅有 p53 功能的丧失并不够。还需要凋亡机制其他特异组分的改变。例如，许多黑色素瘤细胞会出现甲基化，从而使 *APAF1* 基因启动子功能失活。*APAF1* 基因编码的胞浆蛋白能和释放的细胞色素 c 形成凋亡小体并活化 caspase 9。促凋亡基因 *Bax*（见表 9.5）在大多数存在微卫星不稳定性的结肠癌中突变失活（第 12 章）。*BCL2*（人类 bcl-2）在滤泡性 B 细胞淋巴瘤中表达失调，在不同组织来源的多种肿瘤中表达都有上调，据估计，至少有一半的人类肿瘤存在 *BCL2* 的增强表达。

表 9.5　人类肿瘤中发现的抗凋亡变化示例

改变	抗凋亡机制	肿瘤类型
CASP8 启动子甲基化	外源半胱氨酸蛋白酶失活	小细胞肺癌、儿童肿瘤
CASP8 抑制	死亡执行半胱氨酸蛋白酶失活	乳腺癌
Survivin 过表达[a]	半胱氨酸蛋白酶抑制剂	间皮瘤、黑色素瘤等许多肿瘤
ERK 活化	caspase 8 表达抑制	多种肿瘤
ERK 活化	防止 Bcl-2 降解	多种肿瘤
Raf 活化	14-3-3 蛋白隔离 Bad	多种肿瘤
PI3K 突变活化	Akt/PKB 活化	胃肠肿瘤
NF-κB 组成性活化[b]	诱导抗凋亡基因	多种肿瘤
p53 突变	失去诱导凋亡基因	多种肿瘤
$pl4^{ARE}$ 基因失活	p53 水平下调	多种肿瘤
Mdm2 过表达	p53 水平下调	肉瘤
IAP-1 基因扩增	拮抗 caspase 3、7	食道癌、宫颈癌
ARAF1 甲基化	促凋亡蛋白减少	黑色素瘤
BAX 突变	细胞色素 c 失活 caspase 9	结肠癌
Bcl-2 过表达	关闭线粒体通道	半数人类肿瘤
PIEN 失活	高度活化 Akt/PKB 激酶	胶质母细胞瘤、前列腺癌、子宫内膜癌
IGF-1/2 过表达	活化 PI3K	多种肿瘤
IGFBP 抑制	抗凋亡 IGF-1/2 拮抗剂减少	多种肿瘤
激酶 II	活化 NF-κB	多种肿瘤
TNFR1 甲基化	死亡受体表达抑制	Wilms 肿瘤
FLIP 过表达	死亡受体抑制 caspase 8 活化	黑色素瘤或其他
Akt/PKB 活化	促凋亡 Bcl-2 样蛋白磷酸化并失活	多种类型
Stat 3 活化	诱导 Bcl-x_L 表达	多种类型
TRAIL-R1 抑制	对死亡配体反应表达	小细胞肺癌
FAP-1 过表达	Fas 受体信号抑制	胰腺癌
XAF1 甲基化[c]	抗凋亡 XIAP 抑制丢失	胃癌
Wip1 过表达[d]	p53 活化抑制	乳腺癌和宫颈癌、神经母细胞病

a 除了这里所提到的间皮瘤，survivin 在胃癌、肺癌和膀胱癌、黑色素瘤中都是一个凋亡抑制剂，许多 IAP 基因的表达都由 NF-κB 转录因子直接调控。

b 诱导 c-IAP、XIAP、Bcl-x_L 和其他抗凋亡蛋白的合成。

c XAF_1（XIAP 相关因子 1）一般结合并阻止最有力的 IAP-XIAP 的抗凋亡作用。

d Wip1 是一个磷酸酶，能失活 p38MAPK，从而使之不能磷酸化并刺激活化 p53 的促凋亡功能。

另外一个对抗凋亡高度有效的机制来自 PI3K → Akt/PKB 通路的过度活化（6.6 节）。这条通路的活化来自酪氨酸激酶受体和 Ras 癌蛋白的联合作用，它们都能活化 PI3K，从而使 PIP3 水平升高，活化 Akt/PKB。破坏 PIP3 的磷酸酶，即 PTEN 编码基因失活，也有着同样的作用。一旦 Akt/PKB 被聚集的 PIP3 活化，它就能磷酸化并抑制促凋亡蛋白，如 Bad、caspase 9 和 IκB，同时磷酸化并活化 Mdm2，也就是 p53 主要的拮抗剂（表 6.3）。

许多的肿瘤类型，从白血病到结肠癌，都有另外一个机制保护自己免于凋亡，即活化 NF-κB 转录因子的表达。如前所述，NF-κB 在胞浆中常以失活的形式存在，在某些生理刺激因素作用下，可以活化并进入胞核，进而活化大量的下游靶基因（6.12 节）。这些基因大多有促炎症和血管生成功能。另外，还有许多 NF-κB 的靶基因是凋亡拮抗剂，如

IAP-1、*IAP-2*、*XIAP*、*IEX-1L*、*TRAF-1* 和 *TRAF-2*，它们能阻断内途径和外途径凋亡程序。NF-κB 的靶基因被发现的越来越多，而且在许多肿瘤细胞中这些抗凋亡基因（和编码蛋白）的过表达可以和这些细胞中 NF-κB 的过度活化直接相关联。

另一个逃避凋亡的机制在儿童成神经细胞瘤中表现的很明显，*N-myc* 基因的扩增表明了肿瘤的攻击性生长和预期寿命的缩短。对于它本身来说，这种扩增确实威胁神经母细胞瘤细胞的增殖，如前面所述，*myc* 癌基因（*N-myc* 近亲基因）的行为是一把双刃剑。这些癌基因释放潜在的丝裂信号，但同时又强烈地促凋亡。许多神经母细胞瘤细胞通过基因扩增过表达 *N-myc* 看起来解决了这个问题，至少部分的通过甲基化或缺失，失活 caspase 8 编码基因。

外途径细胞凋亡诱导通路常与癌细胞发展相关，事实证明在有些肿瘤细胞中，此通路常是失活的。有些癌细胞表达 FLIP（FLICE-抑制蛋白），一种通过结合死亡受体的死亡结构域而介导外途径凋亡级联反应活化的蛋白，从而阻断这个反应过程和阻止起始 caspase 8 的自我催化活化（见图 9.32）。其他肿瘤细胞通过甲基化 TNFR1 编码基因的启动子从而抑制 TNF 受体的表达。

癌细胞运用的这些策略机制清楚地说明了它们能通过失活凋亡的外途径从而得以存活。这也相应的说明了，免疫细胞经常包围癌细胞，并试图通过释放 TNF 样因子和引起的外途径凋亡程序杀死它们。看到这么复杂的调节凋亡的连线图，也不难推测在这么多的人类肿瘤中，还有很多其他的抗凋亡机制是我们尚未可知的。

9.16 总结与展望

在本书前面的章节，我们重点讲解了推动或阻碍细胞增殖的分子机制。这个机制的调节物也是癌基因和抑癌基因的产物，能够利用细胞外促有丝分裂和抗有丝分裂的信号作用于细胞周期。这些信号最后决定细胞到底是进入活化生长和分裂周期，还是退回到可逆性的静止休眠期，或是进入不可逆的分裂后的分化状态。

在这章，我们着重讲述了一个完全不同的细胞生理过程，它们中的大部分都掌控着细胞内部的健康状况。这些掌控机制对细胞内重要的系统进行连续的监控，包括氧利用、基因组的整个状态及生长调节回路中的信号平衡。如果细胞内监控机制发现某一重要系统被损坏或功能失调，相应的警报系统就会响起，生长就会停止，甚至细胞会诱导活化潜在性的凋亡机制。

p53 蛋白处于这个信号装置的核心位置。不容忽视，各种各样的警报信号最后还是集中于这一个蛋白。根据已发现的细胞应激作用和细胞修复损伤的能力，p53 能暂时阻止细胞周期进展和活化凋亡程序。

自从 p53 蛋白在 1979 年被发现以后的 1/4 个世纪的时间里，*p53* 基因和编码蛋白在 30 000 份以上的科学文献中都是科研工作者研究的主题。这种对单个基因和蛋白异乎寻常的重视反映了这个蛋白的两个核心作用，即在肿瘤发病学中的作用和癌症细胞基因组中突变型 *p53* 等位基因的频繁出现。虽然有着大量的有关 p53 的文献报道，但有关这个蛋白的研究却还在给我们带来源源不断的惊喜（见信息栏 9.8）。

信息栏 9.8　p53 直接作用线粒体　p53 已经被公认为能转录激活核内主要的促凋亡基因而发挥它的促凋亡功能。然而，科学家们也发现，p53 即使被迫停留在胞浆里也能发挥它促进凋亡的作用。他们报道 p53 能够把促凋亡蛋白 Bak 从与抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 的结合中释放出来，而且，p53 能结合另一重要促凋亡蛋白 Bax，并活化它，使之能开启线粒体膜通道，释放细胞色素 c 入胞浆，启动凋亡。因此，p53 在以前猜想的基础上更加直接地参与了活化凋亡机制。但至今仍没弄明白原因的是，为什么人类肿瘤中突变的 p53 缺乏转录激活活性也失去了活化 Bax 的能力。

尽管研究众多，但是研究者们还是未能对因为这个蛋白存在所引起的最复杂的难题给予圆满的答案：为什么哺乳动物细胞交与这个蛋白如此多的重要功能？一个细胞一旦失去 p53 功能，很明显，单一的打击就可以引起众多条件的变化从而导致增殖的停止或引起细胞凋亡。

与我们所遇到的其他肿瘤抑制基因不同，这个基因在癌细胞基因组中通常不缺失。而是，编码单个氨基酸置换的突变等位基因经常被发现，这是 p53 突变蛋白的显性负效应的有力证明。而且，这种轻微的等位缺失破坏野生型 *p53* 功能的效力要远远大于部分或全部 *p53* 编码序列缺失而导致的无效等位基因。

在第 11 章我们将看到，肿瘤发生是一个涉及细胞多重调控通路的复杂的，多步骤的过程。因为 p53 接收来自损伤和不良生理刺激的如此多不同的传感器的信号，p53 功能的丧失在这些步骤中也发挥了重要的作用。例如，在膀胱癌、乳腺癌、肺癌和结肠癌发生的早期阶段，当恶化前的生长开始时，因为磷酸化的存在 DNA 损伤信号已经活化，并活化 ATM 和 Chk2 激酶的功能。此外，ATM 和 Chk2 激酶的 p53 底物也被磷酸化和活化，在肿瘤发生的这个阶段，*p53* 基因还是野生型。这表明了在细胞的这些生长过程中，DNA 损伤是广泛存在的，即使是在肿瘤发生的早期阶段，p53 在这些细胞生长过程中努力抑制细胞增殖，有时甚至导致它们的凋亡。相应的，这些恶化前细胞可以通过灭活 p53 功能从而消除细胞生长抑制和促凋亡作用。

在肿瘤发生的这个阶段，那些缺失了 p53 功能的细胞也会获得某些优势，因为它们有更多的机会可以逃离严重缺氧而导致的 p53 引起的凋亡（一般来说，早期恶化前生长细胞还没有足够的能力使用循环通路中的氧）。而且，因为 p53 诱导潜在性的抗血管形成分子凝血酶敏感素（Tsp-1）的表达，p53 功能的缺失可以加速邻近毛细血管网的发展从而可以解决初始癌细胞所遭遇的缺氧。

在肿瘤的后续发展中，随着恶性程度的增加，p53 功能的缺失会削弱 DNA 损伤修复系统，同时，允许细胞携带损伤基因组存活。因此导致基因组的变更率增高，肿瘤发展速度加快。在肿瘤发展的后期阶段，p53 功能的丧失还会允许细胞在遭受癌基因如 *myc* 的促凋亡副作用也会存活。这些结果揭示了 p53 功能的缺失对于组织，最终对于整个有机体来说是一个多么大的灾难。

p53 失活导致的这种灾难性的后果在后期可能会变得更加复杂，是否 p53 突变的肿瘤细胞会为临床显性，并成为化学治疗和放射治疗的靶点。这些治疗都是直接针对这些细胞内基因组损伤，从而通过凋亡激起它们的死亡。确实，现有的这些抗癌治疗的促凋亡作用是它们有效作用的核心原因，大多阻止肿瘤的进一步生长。不幸的是，在人类肿瘤中常见的 p53 功能的缺失，使得这些治疗措施欠敏感，从而有利于肿瘤的形成。

目前，尽管我们已有大量的对 p53 蛋白的研究文献，但我们对它的认识仍然非常的肤浅。我们需要更多的相关研究，一方面试图把 p53 在人类基因组中调节的基因给出系统的目录，现在有 120 多个基因已知，在表 9.2 中列出了其中的一小部分。另一方面，来自于对 p53 翻译后修饰的分析。如我们所知，p53 的翻译后修饰影响它的稳定性，从而也影响它的胞内浓度。另外，也影响 p53 和其他核内蛋白之间的相互作用，特别是转录因子，从而影响 p53 活化的靶基因。这种调节的复杂性如图 9.35 所示，同时也表示了 p53 的翻译后修饰场所和这种修饰的本质。至少有 6 种不同类型的修饰，包括磷酸化、乙酰化、泛素化、sumoyl、neddyl 和甲基化，修饰细胞内的 p53 分子（sumoyl、neddyl 与泛素基团相似，但对它们所连接的蛋白质的作用却完全不同)。

图 9.35 也显示了其他三个方面的复杂性：①某些氨基酸残基，如丝氨酸 15（S15)，能被多种蛋白激酶磷酸化，至少 5 种不同的激酶能磷酸化这个特殊的残基；②其他残基，如赖氨酸 372（L372)，能通过很多不同的途径被修饰，这个残基可以被甲基化，乙酰化，泛素化或 neddylation；③修饰 p53 的酶，这里列举了至少 28 种，反映了众多不同的信号通路能作用 p53 并影响 p53 的功能。

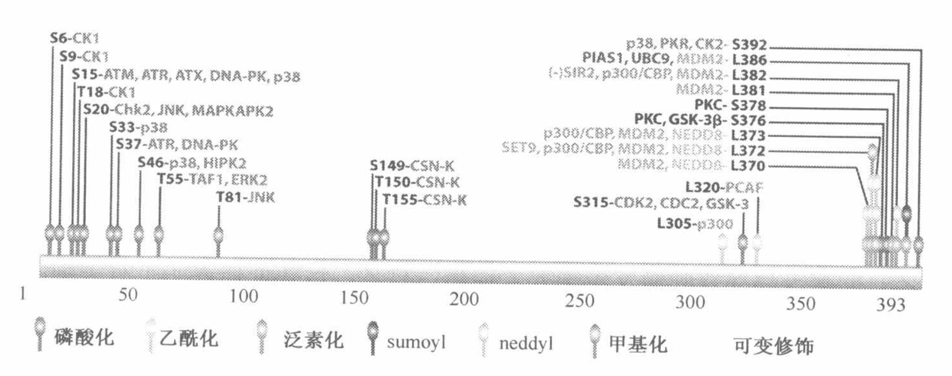


图 9.35　p53 的多种翻译后修饰　多种激酶对 p53 的磷酸化（图 9.12）仅代表了一种对其功能非常重要的修饰类型。除了磷酸化（红色)，其他酶也对它参与了修饰，其中包括在图中所示的氨基酸残基和残基编号（黑色）上的乙酰化（绿色)、泛素化（蓝色)、sumoyl（紫色)、neddyl（橙色）以及甲基化（灰色）修饰，图中，氨基酸残基编号的左侧或右侧标出了已经知道的各种修饰酶（不同颜色)。SIR_2 去乙酸化 p53。(Courtesy of K. P. Olive and T. Jacks.)

p53 的失活只是癌细胞保护自身免于凋亡的众多手段中的一种。这些避免凋亡的手段还反应在其他各个水平，如扰乱死亡受体的表达，活化 caspase 的能力，或者影响 caspase 自身的活性。癌细胞采取的其他保护性措施还有阻止线粒体外膜通道的开放（见图 9.34)。这些不同的机制说明了一个现象，那就是凋亡装置如其他所有优良调节装置一样，都是通过调节那些相互拮抗要素之间的平衡发挥作用。癌细胞通过提高抗凋亡成分的表达水平和活性，从而使之远离凋亡。这些凋亡装置中特异元件的改变联合 p53 缺失的作用，进一步增加癌细胞对通常引起细胞死亡的那些信号的抵抗性。同时，初始癌细胞克隆旁的组织中的胰岛素样生长激素-1（IGF-1）通过减少凋亡可能性对肿瘤的发展也起到了深厚的作用（见补充材料 13 ◎)。

某些生长促进转录因子的活性，特别是 Myc 和 E2F，它们促进凋亡的作用却有点说不通。无论 Myc 还是 E2F 的异位表达，从它们自身来说，使分裂素饥饿细胞离开 G_0 静止期，进入活化生长和分裂周期，跨越 G_1，进入 S 期，为什么这些转录因子在成功完成甚至单个细胞周期之前没有使生长活化细胞凋亡？

一个重要的答案来自于一个事实，那就是在细胞跨过 G_1 期后，活化它们的促凋亡功能，同时也伴随活化抗凋亡信号，这二者之间的平衡决定细胞最后的命运。例如，许多促有丝分裂的生长因子在 G_1 期活化 Myc 和 E2F1 的功能，也活化一定的抗凋亡蛋白，通常是后者渐占优势，使细胞存活增殖。

这又使我们想起另一个问题：为什么丝裂原刺激细胞进入活化生长周期合成一系列促凋亡蛋白，到底是谁的存在使这些细胞接近凋亡深海的边缘？根据一个吸引人的但也只是推测性的模型，无论何时细胞进入生长和分裂周期，它们都随时会遭遇无法预料的危险，特别是发生在 S 和 M 期的事件。这些意外事件能导致基因组的改变，从而引起恶性细胞克隆的外生性生长。所以所有的细胞，一旦进入活化细胞周期，它们的促凋亡装置就会进入警备状态，在它们进行复杂的生长和分裂活动时，对那些快速活化凋亡的信号异常敏感。

随着细胞死亡的各种特征被发现，越来越明显的，我们这章所讲的凋亡，不是程序性细胞死亡的唯一一种形式。第二种死亡程序，也就是**自噬**，在体内各种组织中消灭多余细胞起着越来越重要的作用。当细胞处于营养缺乏状态，这个程序就会活化，相应的，胞质溶酶体消化它们自身胞内细胞器使之再循环，并清除各种化学体有利于它们存活（图 9.36）。

自噬也可以被利用来消灭癌细胞。例如，编码 Beclin-1（一个重要的自噬促进蛋白）的基因，在不同类型的人类癌症中，通常被发现存在低拷贝。在鼠系中，这个基因双拷贝之一的缺失会导致肿瘤发生率大大提高。总之，这些证据表明了有关细胞死亡研究的一个新领域，这与我们对肿瘤发病机制的了解有着明确的关联。

在第 16 章，我们将学习一些最新的治疗思路，即试图动员癌细胞内的促凋亡装置中尚完整的元件。这些治疗才刚开始，我们也才刚开始认识到凋亡通路提示给人们的治疗癌症疾病的困难和可能性。希望在不久的将来，统管凋亡的通路能被更好的了解（可能如图 9.37 的示意图所示），我们能随意地在癌细胞里预测和操纵它的行为方式。

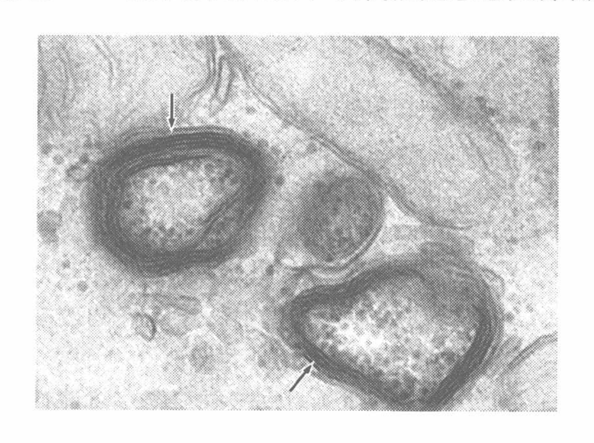


图 9.36　自噬　这张电子显微镜照片显示了正进行自噬过程的细胞胞浆中的多层小囊泡（箭头所示）。多种胞质细胞器混合入溶酶体。在这里，它们破裂释放内容物以用来给细胞提供营养。(Courtesy of J. Debnath and J. S. Brugge.)

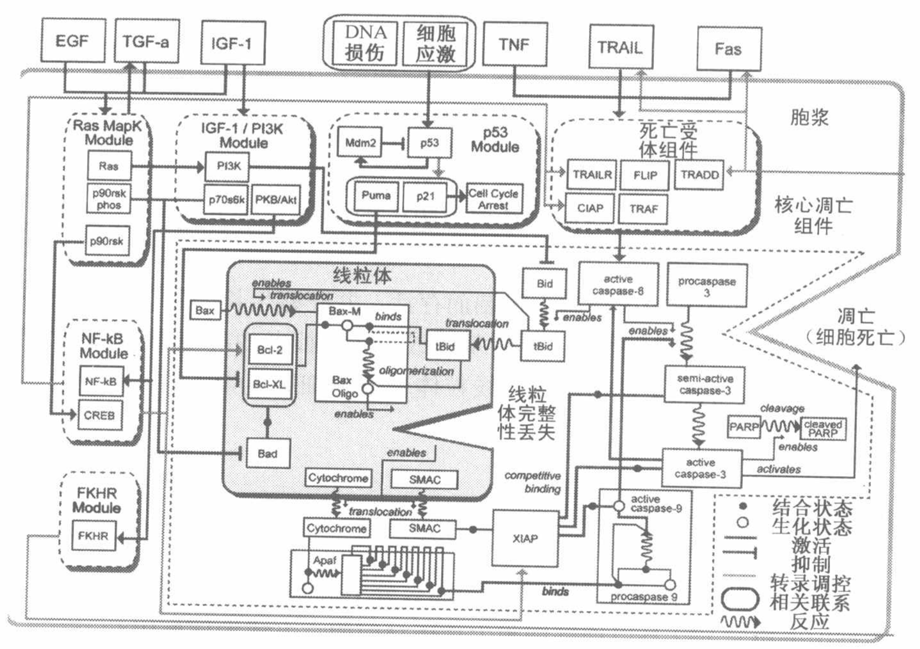


图 9.37　凋亡线路板　调控凋亡的所有元件现在还不完全清楚。凋亡研究的一个目标就是一定程度上清楚细胞内这些调控元件之间是怎么相互作用，最后决定是否起始凋亡。这些工作最后通过数学模型精确预测，凋亡通路对各种胞内外信号到底是如何反应。信号系统模型建立的初步尝试如图所示。(Courtesy of I. Khalil and Gene Network Sciences，Inc.)

重要概念

- 有机体试图通过 p53 警报蛋白阻止肿瘤发展，p53 能在调控细胞增殖装置紊乱或细胞暴露于各种生理刺激的情况下，使细胞进入休眠期或凋亡状态。
- p53 正常情况下快速代谢回转，但在多种细胞生理刺激或 DNA 损伤信号下这种周转就会阻滞。
- 人类肿瘤中的突变 p53 通常携带氨基酸替换。并使突变 p53 干扰野生型 p53，形成四聚体复合物。
- p53，功能上为一转录因子，可以通过诱导 p21 表达而使细胞周期停滞，也可以通过诱导许多促凋亡蛋白表达而导致细胞凋亡。
- 许多细胞生理刺激能导致 p53 活化，包括缺氧、基因组损伤、细胞内生长调节机制的信号失衡。
- 当正常的快速降解被阻滞时，p53 被功能活化，并且由此蓄积的 p53 的共价修饰赋予转录因子活性。
- p53 水平由两个重要的上游调控者调节，那就是 Mdm2 和 $p19^{ARF}$。
- pRb 通路的失调导致 E2Fs 过度活化，继而引起 ARF 和 p53 活化。
- 凋亡是细胞内一个复杂的反应程序，能被 p53 及外界刺激细胞信号活化。

- 凋亡包括了 caspase 的激酶级联反应，通常在 1h 内导致细胞破坏。
- caspase 的激酶级联反应可以通过线粒体外膜通道开放，释放许多促凋亡蛋白，特别是细胞色素 c 而活化。
- 线粒体外膜通道的开放由 Bcl-2 相关促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的相对水平所决定。
- caspase 的激酶级联反应也可以由细胞表面死亡受体活化。
- 凋亡功能的丧失可以使癌细胞在一系列细胞生理刺激下存活，这包括缺氧、信号失衡、DNA 损伤和锚定丧失。
- 癌细胞可以通过许多途径失活凋亡机制而存活，并旺盛生长。如 Akt/PKB 活化，抗凋亡 Bcl-2 相关蛋白水平的增长，p53 基因或上游调控者的改变导致的 p53 失活，许多促凋亡蛋白基因启动子的甲基化，线粒体释放的细胞色素 c 的干扰，caspase 的抑制等。

思考问题

1. DNA 肿瘤病毒可以抑制感染细胞凋亡，那么分子机制到底是什么？
2. 什么类型因子决定 p53 是以抑制细胞生长还是促凋亡方式发挥作用？
3. 对于凋亡装置元件失活的癌细胞，抗癌治疗作用怎样才能取得成功？基于已知的生理刺激可以活化 p53 诱导凋亡，那么，可以研发什么样的抗癌治疗药物治疗癌细胞？
4. 如果在体内所有组织全面抑制凋亡，你觉得能预测到哪些副作用？
5. 凋亡装置成分的缺失怎样使癌细胞比正常细胞对某些类型细胞死亡更加敏感？
6. 你能列举出所有在肿瘤发展过程中癌细胞必须面对的凋亡诱导生理刺激吗？

参考读物

Ashkenazi A & Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.

Baehrecke EH (2002) How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 779–787.

Bartek J & Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinase in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429.

Baserga R, Peruzzi F & Reiss K (2003) The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int. J. Cancer* 107, 873–877.

Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8, 569–581.

Calle EE & Kakas R (2004) Overweight, obesity, and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4, 579–591.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K & Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 348, 1625–1638.

Cory S & Adams JM (2002) The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656.

Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.

Downward J (1998) Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 49–54.

El-Deiry WS (2003) The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22, 7486–7495.

Fürstenberger G & Senn H-G (2002) Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol.* 3, 298–302.

Giaccia AJ & Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12, 2973–2983.

Ginsberg D (2002) E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.* 529, 122–125.

Giovannucci E (2003) Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Horm. Metab. Res.* 35, 694–704.

Green DR & Evan GI (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19–30.

Harris CC (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17, 1187–1198.

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776.

Hursting SD et al. (2003) Calorie restriction, aging and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu. Rev. Med.* 54,131–152.

Igney FH & Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288.

Karin M & Lin A (2002) NF-κB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221–227.

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.

Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.

Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 342, 307–315.

Martinou JC & Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 63–67.

Melino G, De Laurenzi V & Vousden KH (2002) p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 605–615.

Michael D & Oren M (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* 13, 49–59.

Nevins JR & Vogt PK (1996) Cell transformation by viruses. In Fields Virology, 3rd ed (BN Fields, DM Knipe, PM Howley eds), pp 301–343. Philadelphia: Lippincott–Raven.

Pollak MN, Schernhammer ES & Hankinson SE (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 4, 505–518.

Reed JC (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 2941–2953.

Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157, 1415–1530.

Riddle DL and Gorski SM (2003) Shaping and stretching life by autophagy. *Dev. Cell* 5, 364–365.

Robles AI, Linke SP & Harris CC (2002) The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* 21, 6898–6907.

Salvesen GS & Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 401–410.

Sharpless NE & DePinho RA (1999) The *Ink4A/Arf* locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 22–30.

Sherr CJ (2001) The *Ink4a/ARF* network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 731–737.

Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.

Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.

Sherr CJ & Weber JD (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 94–99.

Smith GD, Gunnell D & Holly J (2000) Cancer and insulin-like growth factor-I. *BMJ* 321, 847–848.

Soussi T & Béroud C (2001) Assessing *TP53* status in human tumors to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 1, 233–240.

Varley JM (2003) Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* 21, 313–320.

Vaux DL, Cory S & Adams JM (1988) *Bcl-2* gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-*myc* to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.

Vogelstein B, Lane B & Levin AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.

Vousden KH & Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 595–604.

Zahir N & Weaver VM (2004) Death in the third dimension: apoptosis deregulation and tissue architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 71–80.

Zamzami N & Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 67–71.

（詹启敏　宋咏梅　李　丹　邹丽辉）

第 10 章　永恒的生命：细胞永生化与肿瘤形成

死亡是由于耗尽的机体组织不能持续地自我更新而导致生命活动的终止，因为通过细胞分裂来维持增殖和组织更新的能力是有限的。

August Weissmann，生物学家，1881 年

在前面的几个章节中，我们描述了肿瘤细胞的生物学特性，首先提到癌基因的激活，同时指出抑癌基因的缺失是细胞癌变的重要原因。细胞癌变和肿瘤的发生、发展不是一朝一夕就出现的，这一过程往往需要经历数十年的时间，关于这一点我们将在第 11 章中进行详细阐述。

在机体的发育过程中，人体细胞是通过增殖分裂周期的机制实现不断更新的，这种方式类似与肿瘤细胞的增殖状态。但是，肿瘤细胞的增殖不同于正常细胞，往往表现为短时间内的过度增殖和失控性生长，可称为恶性增殖。而正常细胞的增殖能力是有限的，丧失增殖能力的细胞最终以凋亡的方式终止其生命活动。

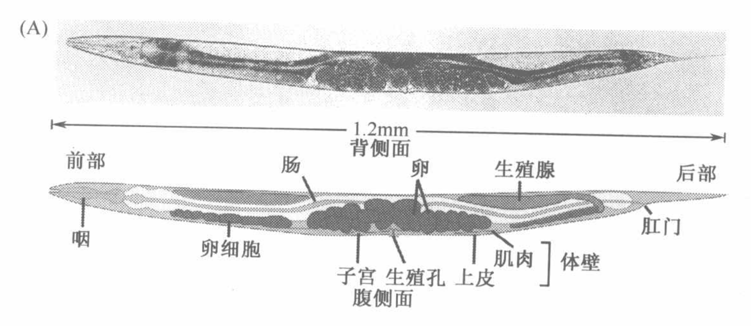
这些事实告诉我们一个简单而又不可忽视的观点：在肿瘤的形成过程中，癌变细胞必须突破正常细胞原有寿命的限制，进一步通过异常的细胞分裂获得无限增殖能力，才能够最终完成多阶段的致瘤过程。本章节将阐述细胞增殖能力的调节机制和失控性生长的细胞如何癌变并发展成为临床可见的肿瘤。源于这一调节机制的改变，细胞获得无限制增殖能力，即表现为细胞的永生化，这一生物学特性就是肿瘤生长的决定因素。

10.1　正常细胞发育取决于早期胚胎原始细胞的遗传信息

在多细胞动物（后生动物）中，如人类，每一个体的发育都源于一个祖细胞（受精卵）。在其他方面，细胞分裂，使原本存在于胚胎中的祖细胞形成很多子代细胞，通常我们命名为**细胞谱系**（cell lineage）。事实上，在相对简单的多细胞动物中，如秀丽隐杆线虫，其成体中可追踪到细胞谱系的体细胞总数仅为 959 个（图 10.1）。

大多数情况下，对于复杂的多细胞哺乳动物，由于细胞增殖分裂的总数是巨大的。例如，成人的细胞总数约为 10^{14} 个，在一生中将有 10^{16} 次细胞分裂。我们能够想象每一个体是不同细胞的有机整合而不是随机的堆砌，但是我们无法了解其细胞谱系的确切状态。

以秀丽隐杆线虫（*C. elegans*）为例，发育过程——从早期胚胎的形成到特定细胞构成的有机体都依赖于一定的细胞谱系（8.11 节）。事实上，发育生物学家更关注单个细胞在不同细胞谱系中如何获得来自周围信号的影响，从而分化成具有不同生物学功能的细胞或组织。确实，在这些章节中并未涉及与肿瘤发生的关系，而重点阐述在生物体一生的生命活动中，究竟哪一类特殊的细胞谱系控制和决定着细胞的增殖？是否每一个不同谱系亚型细胞的增殖都是不确定的，或每一细胞谱系的增殖是预先设定并是有限的？



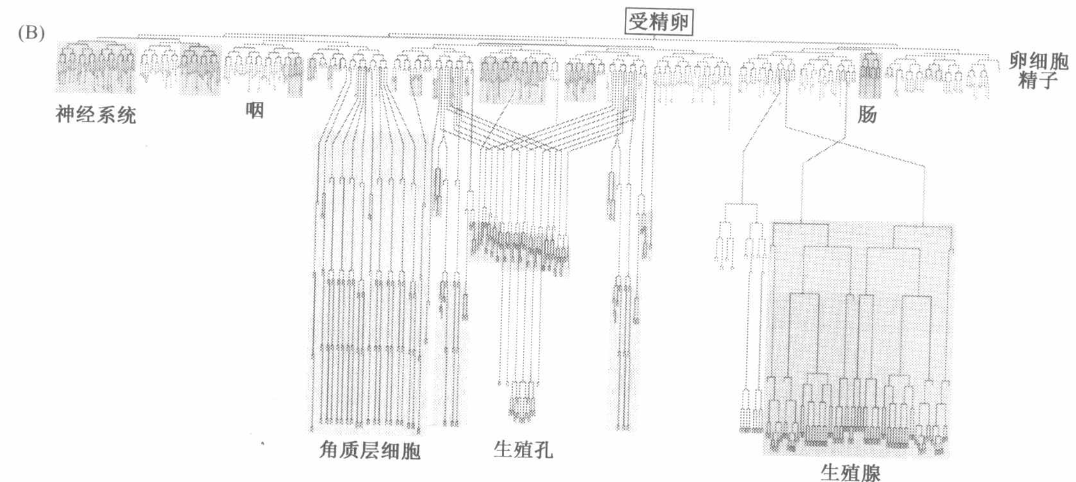


图 10.1 组成蠕虫机体的细胞 (A) 成年秀丽隐杆线虫由 959 个体细胞组成，这些细胞都源于同一个受精卵。(B) 显而易见，在增殖过程中许多细胞通过凋亡等方式终止生命。每个分支中的细胞注定要形成某种特异组织。例如，右侧的大多数细胞参与性腺形成，而最左侧的一小部分细胞形成了神经系统。(A, from J. E. Sulston and H. R. Horvitz, Dev. Biol. 56：110-156，1977. © Academic Press；B. University of Texas Southwestern Medical Center.)

我们现有的技术还不能精确描述在人或小鼠体内这些具有特殊功能细胞的增殖和分裂过程。但通过体外细胞培养实验研究，我们能够初步了解某种细胞系的增殖能力。例如，从活体组织中分离成纤维细胞，通过细胞培养并测定细胞倍增时间以确定细胞的增殖能力。事实上，这一实验需要经过**连续传代**，为了维持细胞的增殖状态，当第一代培养细胞长满培养皿时，要将细胞消化传代到新的培养皿中，这一过程可以反复进行。

早在 20 世纪 60 年代初期，人类就证明了体外培养的啮齿动物或人类胚胎细胞的增殖能力是有限的。Leonard Hayflick 发现，培养的细胞在一定数目的增殖周期后，开始步入老化期（**复制性衰老**或简称**衰老**，图 10.2）。通常老化细胞保持代谢活性但失去了重新进入细胞周期进行复制的能力。这些细胞在单层培养时体积增大，具更丰富的胞浆，只要给予充足的营养和生长因子，细胞可存活几周或几个月。这类细胞经常被描述为“油煎蛋”形状（图 10.3），生长因子能维持这些老化细胞生存长达一年，但不能刺激细胞增殖。

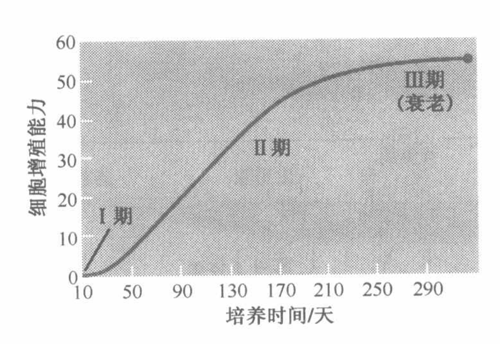


图 10.2 传代培养细胞增殖能力分析 Leonard Hayflick 通过测定细胞倍增时间，确定人成纤维细胞增殖能力。显而易见，这些细胞从活组织中进行原代培养（I期），能快速增殖到60代（II期），直到进入老化阶段（III期），此时细胞仍有活力但失去增殖能力可持续一年之久。与正常的生长良好的未老化增殖细胞相比，老化细胞虽表达生长因子受体，但为何下游的信号通路不能被激活的机制有待进一步阐明。(From J. W. Shay and W. E. Wright, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:72-76, 2000.)

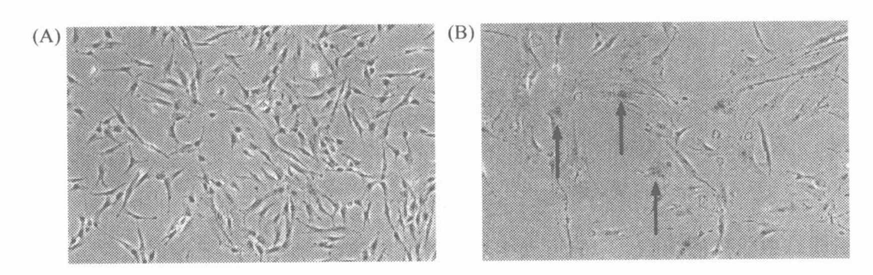
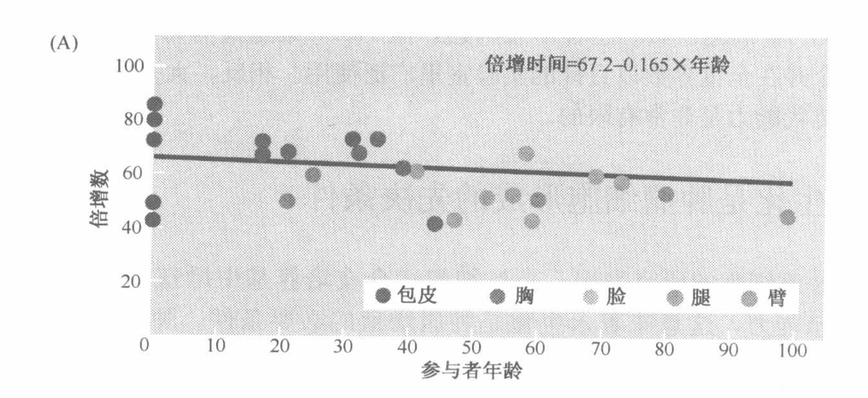


图 10.3 体外培养原代细胞和老化细胞的形态学比较 （A）显示相差显微镜下具有增殖活力的老化前期细胞，并保持着初代细胞的形态。（B）显示一旦细胞进入老化阶段，虽然能维持存活，但丧失了增殖能力。许多老化细胞的形态具有丰富的胞浆犹如"油煎蛋"形状（显微照片的放大倍数相同）。老化细胞能特异性表达与衰老相关的物质——酸性β-半乳糖苷酶，与培养的初代细胞相比，老化细胞中出现明显的阳性染色（箭头所示蓝色）。(Courtesy of C. Scheel.)

良好的未老化细胞与活跃增殖的细胞一样，而衰老的细胞虽然含有生长因子受体，但下游的信号通路未被激活，其机制仍旧是一个未解之谜。

培养细胞增殖能力和传代次数的结果表明，细胞老化基于供体细胞的类型，组织器官和年龄等。已有的实验结果表明，胚胎或新生儿来源的细胞其传代能力比成年个体的细胞更强，一般可传 50～60 代（如图 10.4）。这一生物学行为提示成年个体的细胞在进行原代培养之前可能已丧失了部分增殖能力，但这一点还缺少实验证据。

胚胎干细胞（ES）则显示相反的生物学特性，这类细胞是来源于早期胚胎组织并已分化成不同的细胞亚型，在合适的培养条件下（信息栏 10.1）这些细胞具有无限增殖的潜能，因此又称为**永生化**（immortal），这个术语可能会有些误导，但其定义是基于 ES 细胞中的永生化细胞谱系而不是个体的 ES 细胞。



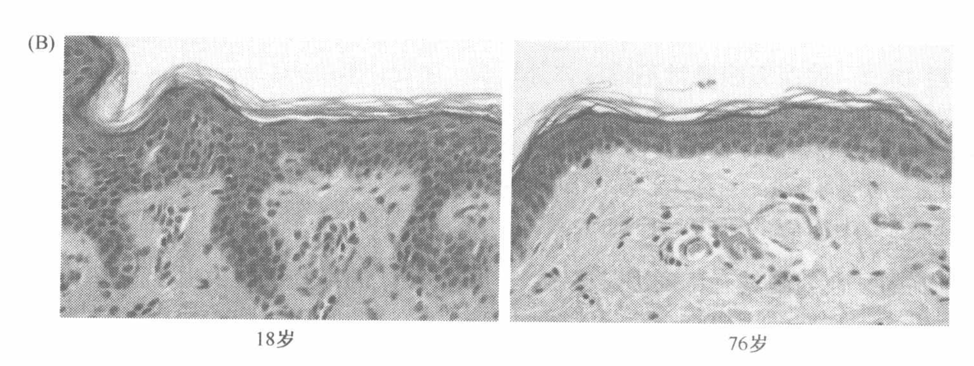


图 10.4 细胞增殖能力与机体的年龄呈反比 (A)细胞增殖能力可以通过对一类细胞的体外培养的群体倍增时间(PDM)确定。例如，皮肤成纤维细胞的倍增时间取决于供体年龄及所取组织的类型(不同个体的细胞增殖能力存在较大差异)。散点图显示每个年龄段细胞的平均倍增时间。(B)显示皮肤的角质化干细胞随着年龄的增长逐渐失去增殖能力，以及皮肤的再生能力都随之下降，从而形成薄层的角质化细胞(深粉色)，失去了年轻皮肤应有的嵴样结构。左图是 18 岁年轻女性的健康皮肤，右侧是一位 76 岁女性的衰老皮肤。(A, courtesy of J. G. Rheinwald and T. M. O'Connell-Willstaedt; B, courtesy of T. Brenn.)

信息栏 10.1 为何来自老年个体的细胞增殖能力弱于较年轻的个体? 简而言之，来自老年个体的细胞容易较快停止增殖(图 10.4)。这可能是老年个体的细胞已经在体内经历了更多的细胞分裂周期，因此耗费了部分的倍增能力。事实上，其他的解释也同样合理，诸如，长期暴露在活性氧(ROS)的状态下或其他损伤因素也会破坏细胞的许多成分，因此，在随后的体外培养中观察到细胞增殖能力丧失，但是增殖能力的丧失与细胞传代次数无关。

综上所述，这些观察到的现象表明一种观点：在胚胎发生的初期，细胞具有无限复制的能力，但是针对于特殊的机体细胞，如皮肤的成纤维细胞、神经元细胞、乳腺上皮细胞等，在胚胎发生的后期似乎也具有一定的增殖能力。肿瘤细胞的增殖能力与 ES 细胞比较相似，如许多体外培养的肿瘤细胞，只要提供适当的营养和条件就能进行无限传代。

HeLa 细胞就是一个最具代表性的证据。在过去的半个多世纪里，体外培养细胞已广泛用于分子生物学领域的研究。HeLa 细胞是 1951 年在美国马里兰州巴尔的摩(Baltimore)用一位名叫 Henrietta Lacks 的年轻宫颈腺癌患者的肿瘤组织培养而建立的细

胞系，称为 HeLa 细胞。虽然患者不久病逝，但 HeLa 细胞具有每天增殖一代的能力，稳定传代至今并在全世界数以百计的实验室里广泛使用。相反，大多数正常细胞离体后的体外培养传代能力是非常有限的。

10.2 永生化是肿瘤细胞形成的先决条件

我们对肿瘤细胞的研究发现，一旦细胞适合在培养基中增殖（信息栏 10.2）即获得无限增殖能力，这意味着永生化是肿瘤增殖的必要条件。肿瘤的形成要求细胞获得永生化。相反，正常细胞缺乏永生化的潜力。也许，机体正常细胞的增殖能力是有限的。

信息栏 10.2 肿瘤细胞通常不适应体外培养 多数正常组织的细胞进行体外培养时，通常难以长期生存和增殖，许多类型的肿瘤细胞也是如此。同正常细胞一样，大多数肿瘤细胞的增殖和生长需要其他类型细胞的支持，这方面的内容将在第 13 章详细讲述。由于人们在体外培养肿瘤细胞时，往往以失败告终，因此得出结论：人类肿瘤组织中能获得永生化的肿瘤细胞只是很少的一部分并能够适应体外培养以获得无限增殖能力。

复制的子代细胞具有免疫逃避机制。例如，机体的某些细胞中由于癌基因激活或抑癌基因失活，它们的后代将会获得无限增殖能力，这些肿瘤细胞的数目将会呈指数级增长。但是，如果这些突变只赋予细胞有限的增殖潜能，那么这类细胞的倍增能力不足以形成对人体构成威胁的肿瘤。

这一模型的可信度取决于一些重要的数据。例如，临床上可检测到的肿瘤需要多少肿瘤细胞（图 10.5A）及多少代增殖能影响到正常机体的生命活动。我们知道肿瘤是克隆性生长的，这意味着肿瘤组织中的所有细胞都来源于共同的祖细胞，而这个细胞在某个时期发生了转化（2.5 节），基于这一点，我们需要了解祖细胞经过多少代增殖能够发展成较大体积的肿瘤。

通过测算，已确定 $1cm^3$ 的肿瘤组织大概含有 10^9 个细胞，一般说来，肿瘤块体积达到 10^3cm^3 即可对生命构成威胁。我们可以计算出 10^{12} 个细胞大约需经历 40 次的指数性增殖（图 10.5B）。也就是说，祖细胞经过 40 次细胞分裂最终形成具有侵袭性生长的肿瘤（$10^3 \cong 2^{10}$；因此 $10^{12} \cong 2^{40}$）。

然而，前面提到，某些正常细胞在体外培养时，在衰老并停止增殖之前能分裂增殖 50～60 代。通过上述的测算可知，50～60 个周期的细胞指数级增殖产生的后代细胞数目远远超过足以威胁人体生命的肿瘤细胞数。实际上，若以此推理大约 10^{18} 个细胞需经过 60 次的细胞周期分裂能产生的肿瘤体积大约是 10^9cm^3，重量大约为 10^6kg，这个数据可能是错误的！

这一测算错误的原因在于对这一问题的片面认识：假设肿瘤细胞群体呈指数级的增长（图 10.5A 和图 10.5B），但肿瘤增殖的生物学行为大不相同。由于机体具有一系列的防御机制，初始的肿瘤细胞增殖将受到抑制，每一代增殖都有大批细胞死亡（图 10.5C）。在肿瘤发展早期，机体的防御机制会切断肿瘤细胞所依赖的生长因子、氧的供应，同时使其不能通过血管系统排除代谢产物。甚至，这些防御机制能够清除行为异

常的、具有恶变潜能的癌前病变细胞（见第 9 章）。这样使每一代增殖的肿瘤细胞都有耗损，肿瘤组织中细胞的生物学行为不尽相同（图 10.5D），肿瘤细胞在增殖的同时，会有大量的细胞发生死亡并形成不同的增殖细胞谱系。

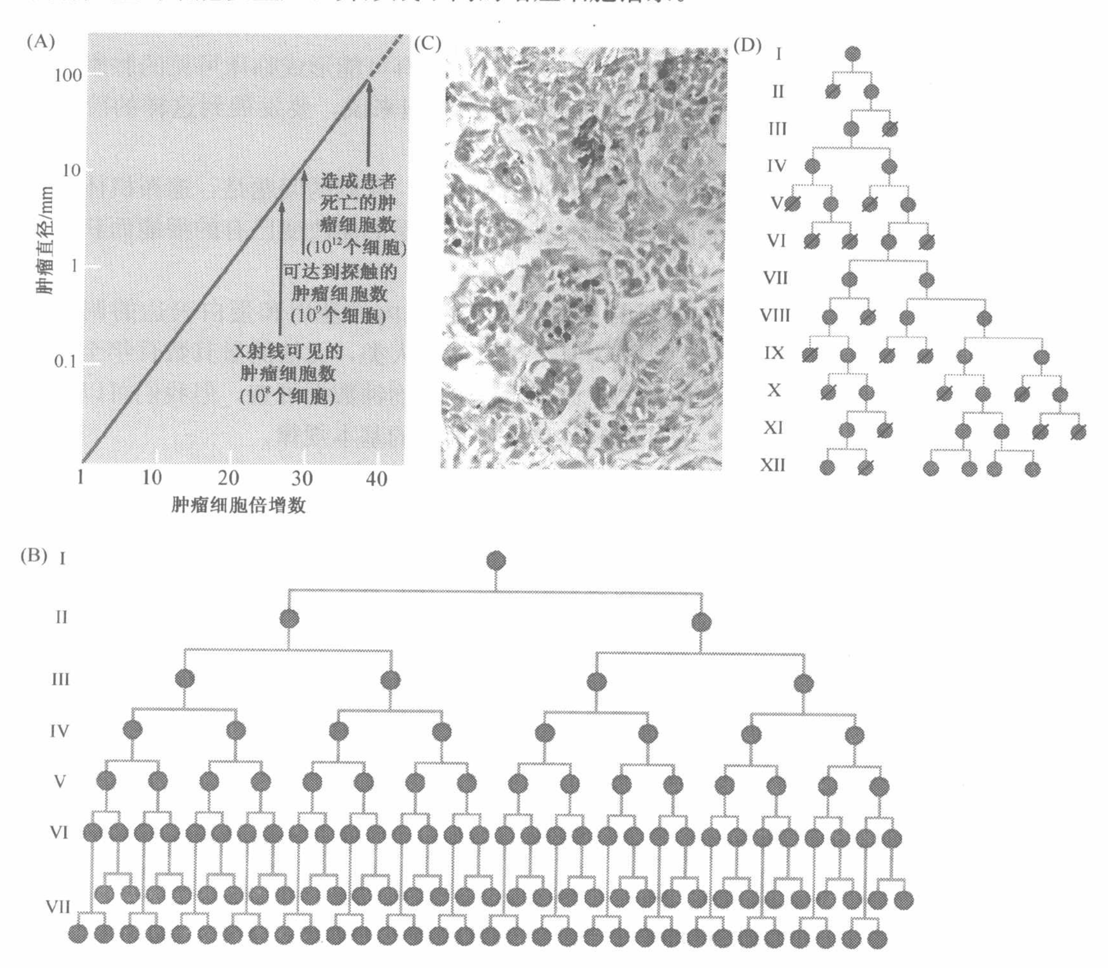


图 10.5　肿瘤细胞增殖谱系模式图　(A) 肿瘤大小和细胞数与首次 X 射线影像学检查、临床占位性病变及危及生命的关系。(B) 原则上，细胞每分裂一次，细胞群作为一个整体都得到倍增（前 6 代显示）。从图 A 可估算出，一个祖细胞的后代大约需要 40 个分裂周期即可形成一个致命的瘤体。(C) 但事实上，每一代增殖的细胞，包括癌变前期或已癌变的细胞，都有不同程度的衰亡。采用 TUNEL 染色（深棕色为阳性，见补充材料 3B）可显示携带有 *Wnt-1* 的转基因小鼠乳腺肿瘤中的凋亡细胞。已有研究结果表明，原先估计的每一代增殖细胞中凋亡细胞的数目远小于实际数目，因为凋亡细胞被邻近细胞或巨噬细胞消灭之前仅能存在 1h。(D) 高频率的细胞衰亡使得每一代增殖细胞都丧失大量的细胞（“/”标志显示）。以此推论，一个祖细胞在第 12 代时应该产生 2^{11} 个子代细胞，实际上却只有 5 个细胞存活。所以，癌变细胞要发展成一个对机体有危害的临床占位性肿瘤需要的时间和增殖分裂次数是难以测量的，对这方面还缺乏明确的认识。(A, from B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; C, courtesy of L. D. Attardi and T. Jacks.)

这一生长与消亡并存的增殖方式意味着形成肿瘤所需细胞数目要比理论上指数级增长所需的细胞数多得多。例如，按照指数级增殖计算，肿瘤祖细胞经过 10 次分裂就可达 10^3 个细胞，而实际上，它需要经过 20～30 代，甚至更多代的增殖才可能积累这么多的细胞。有精确的证据支持一种观点：正常情况下，人体只有少数细胞参与增殖和分裂以防止肿瘤的发生。例如，细胞需经过 100 代增殖才有可能形成临床可见的肿瘤，对于只有 50～60 代的增殖分裂潜能的初始阶段的肿瘤细胞来说，要发展到这样的阶段是极其困难的。

至少到目前为止，人们已经接受这样的认识和结论。我们的问题是：遍布机体的正常细胞如何记忆储存其复制的潜能？而那些癌变细胞又是如何改变已有的潜能而获得无限增殖能力并形成临床可见的占位性肿瘤？

要回答生命繁衍的规律这一问题的关键是阐明细胞内的基因和蛋白表达的调控机制，这是一个极其困难的科学问题。作为复杂生物体的人类，无法测量其数百年至数千年前祖先繁衍至今经历了多少代增殖的记录，也没有生物钟数据可查，但我们可以借助于谱系学家的研究回答生物体、人体细胞如何增殖繁衍的基本规律。

此外，发育生物学家认为，世代繁衍的机制可能与细胞的**自主性**（cell-autonomous）类似；是一种内在的，不受与之相互作用的周边细胞乃至机体的影响。癌基因和抑制癌基因与此相反，这些基因产物能够使具有非自主性的周边细胞中与其对应的信号通路发生紊乱。最终，假设的细胞增殖繁衍规律必须与其生物化学机制相符。因为细胞谱系增殖需要的信息通常需存储几十年。

原则上，“世代钟”（反映细胞的世代而不是具体耗用的时间）的测量可能依靠一些细胞内的可溶性分子，这种分子的特征是：①在发育早期合成，随后不再合成；②在胚胎组织的各种祖细胞都有高水平的表达；③在每增殖一代中都以 2 倍稀释，其浓度降到某种水平之下意味着衰老。这一点在数学上看似乎能够成立，但在生物学领域有极大的争议。生物化学研究的结果显示，在 1 个细胞中没有一种分子的浓度能够超过 2^{50} 或 2^{60}。

研究者将回答这一问题的目标集中到对生物世代钟分子机制的探索。他们偶然发现两种能影响体外培养细胞增殖能力的调节机制，推测在体内可能也相似。第一种是测量细胞谱系累积的生理应激反应，一旦累积的损伤超过一定阈值，细胞便停止增殖进入衰老期。

第二种调节机制用来测量一个细胞谱系经历了多少代复制，一旦细胞分裂增殖潜能耗尽，会产生一种更强烈的信号：通常描述为坏死，此时将导致多数细胞发生凋亡。我们将深入阐述诱导细胞衰老和坏死的机制。

10.3 细胞的生理应激可加速细胞有限增殖?

改变体外培养条件的实验为细胞增殖过程中衰老的原因提供了证据。其中，最显著的变化来自氧分压，当体外培养细胞的氧含量从 20%降低到 1%～3%，细胞生存周期大幅度延长。其中一组实验结果表明，人二倍体成纤维细胞在 1%氧浓度时的增殖周期要比在 20%氧浓度时延长 20%；另一组实验结果表明，当氧浓度 3%与 20%相比时，

细胞的增殖能力可提高50%（图10.6A）。低氧浓度能更确切地反应活体组织中的氧浓度，而不像常规组织培养箱里提供的氧分压。此外，对于上皮细胞，基质饲养层对细胞生存和增殖也具有较大的影响（图10.6B）。

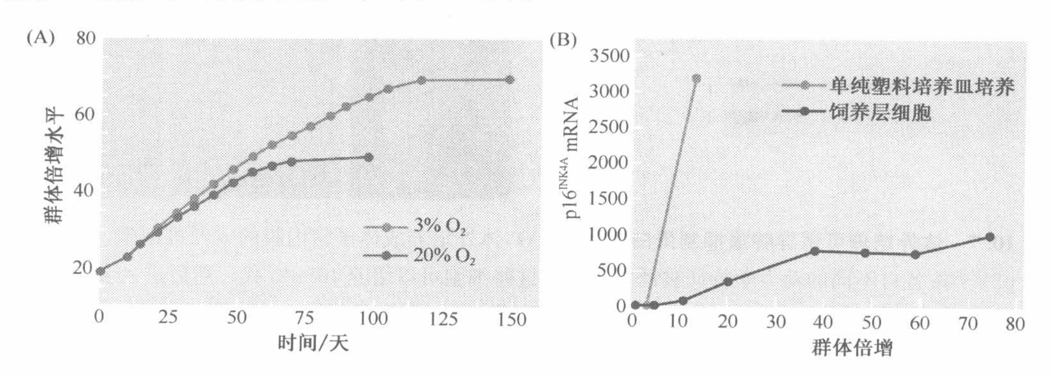


图10.6 培养条件对细胞衰老的影响 （A）图中显示了3%或20%的氧含量的培养条件对细胞群体增殖能力（群体倍增水平，纵坐标）的影响。3%的氧浓度更接近活体组织细胞的实际生理状况。（B）体外培养细胞依赖于正常上皮细胞或基质成分的支持，并对各种外界的刺激发生应激反应。当培养成年人的包皮角化细胞，细胞很快诱导出$p16^{INK4A}$肿瘤抑制蛋白（绿线，见8.4节），并导致细胞的生长停滞及衰老。而当这些细胞在由成纤维细胞形成的饲养层细胞上培养时（棕色线），没有诱导出足以引起衰老的$p16^{INK4A}$蛋白，因而细胞的生长增殖期明显延长。（A，from Q. Chen，A. Fischer，J. D. Reagan et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92：4337-4341，1995；B，from B. Fu，J. Quintero，and C. C. Baker，Cancer Res. 63：7815-7824，2003.）

其他证据也表明氧化损伤的积累可引起衰老。例如，培养老化细胞产生的氧化鸟嘌呤较年轻细胞增加了4倍，这表明体外培养逐步造成线粒体功能损伤，导致其中的活性氧（ROS）成分增加，使细胞中氧化损伤成分大量堆积，引起染色体DNA的损伤并诱发细胞衰老。

令人不解的是，在体外培养的各种人类细胞中，这两种重要的CDK的增殖抑制剂——$p16^{INK4A}$和$p21^{Cip1}$的表达水平为高水平表达（图10.7A），并发现在体外培养的未老化的角质细胞中的肿瘤抑制基因$p16^{INK4A}$失活。如前所述，$p16^{INK4A}$蛋白表达一旦超过一定水平，将阻断cyclin D和CDK4/6的磷酸化，进一步引起pRb磷酸化水平降低并终止细胞的进一步增殖（见8.4节）。同样，$p21^{Cip1}$能使细胞周期停滞，其作用可能更为广泛，它能够阻滞所有细胞周期依赖性激酶（CDK）的信号转导，包括晚G_1期、S期、G_2期和M期。

$p16^{INK4A}$的异位表达（图10.7B）使细胞具备更多的衰老特征。已有的研究结果表明体外培养的细胞通过诱导关键的CDK抑制因子表达对外界的应激做出反应，一经诱导，这些蛋白迫使细胞产生许多与衰老相关的特性。通过异位表达高水平的CDK4可显著抑制培养的人角质细胞的早衰现象，这种细胞周期依赖性激酶（CDK）能阻断$p16^{INK4A}$（见图8.13），使细胞增殖停止，从而诱导细胞衰老。

如图10.7A显示，$p21^{Cip1}$的诱导表达发生在接近老化的细胞中。在这些老化的细胞中，$p21^{Cip1}$能增加p53抑制癌基因的蛋白质表达水平与活性。在一些细胞，如在胎鼠的成纤维细胞（MEF）中，一旦p53表达通过$p21^{Cip1}$抑制细胞增殖，细胞衰老过程中p53

水平增加了10～40倍。同 $p16^{INK4A}$一样（图 10.7B）$p21^{Cip1}$蛋白的异位表达能诱导细胞出现衰老特征。

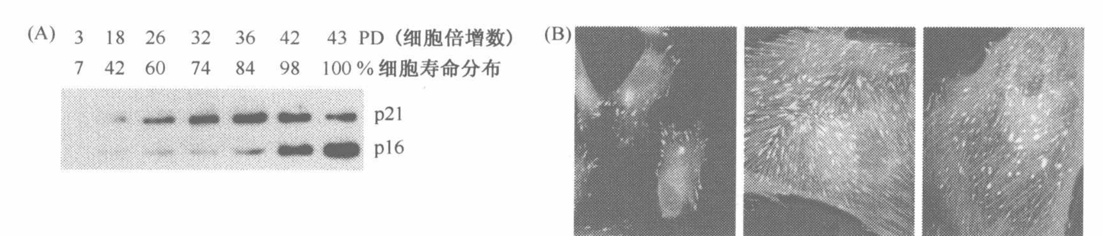


图 10.7 体外培养可诱导肿瘤抑制蛋白表达 （A）体外培养成体子宫内膜的成纤维细胞，$p16^{INK4A}$和 $p21^{Cip1}$按各自不同的动力学特征被诱导表达。这些细胞可以培养40～43代，然后进入衰老状态。（B）与衰老细胞（中图和右图）相比，正常细胞（左）体积相对较小，与基质（黄色）的灶性接触相对较少，肌动蛋白张力丝较少（橙色）。$p16^{INK4A}$的异位表达诱导出细胞（中图）的表型，与衰老细胞之间没有显著差异（右图），可能是由于对CDK4 和CDK6的抑制，以至于阻断了pRb的磷酸化。（A，from S. Brookes，J. Rowe，A. Gutierrez del Arroyo et al.，Exp. Cell Res. 298：549-559，2004；B，courtesy of I. Ben-Porath.）

我们可以想象与那些体外培养的细胞相似，组织中的微环境迫使癌前或已癌变的细胞适应各种生理应激。事实上，如第8.9节所示，人类大多数肿瘤细胞与体外培养过程情况类似，通过使pRb和p53信号通路失活以避免细胞衰老（图10.8）。因此，当肿瘤细胞从瘤组织中分离出来进行体外培养，通过失活Rb和p53信号通路可能有助于细胞适应体外培养条件而避免老化。

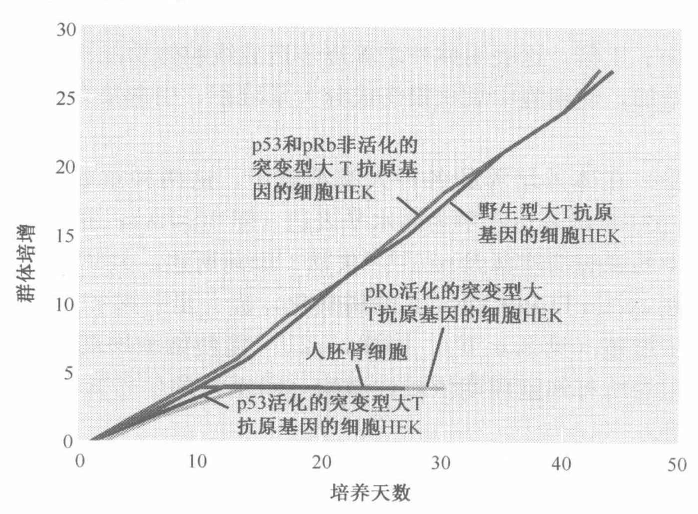


图 10.8 大T抗原（LT）在抗衰老中的作用 通过对人类各种细胞的研究显示，pRb和p53的失活对于阻滞细胞衰老是必要的，通过转染SV40的大T抗原（LT）可以防止细胞老化。如图，人胚胎肾细胞（HEK）在体外培养10～12代后，出现衰老现象（灰线显示）。然而，如果这些细胞通过转染野生型LT（深蓝线条）或能够结合并抑制p53和pRb的突变型大T抗原基因（红线显示），细胞即可渡过老化期，继续保持增殖状态。而不能结合并抑制p53（棕色线条）或pRb（浅绿色线条）的突变型LT则不能阻止细胞老化。（From W. C. Hahn，S. K. Dessain，M. W. Brooks et al.，Mol. Cell Biol. 22：2111-2123，2002.）

与上述设想一致，将SV40的大T抗原转染原代培养的人成纤维细胞和上皮细胞能阻止细胞发生老化（图10.8）。大T抗原通过阻断肿瘤抑制蛋白p53和pRb的作用（见补充材料12◎），促使细胞能够适应生理应激反应。

当研究者将细胞体外培养的模式拟合于体内的环境时，细胞谱系的生命周期快速延长，同时体外培养的细胞老化现象延迟。但在有些细胞上这种现象并未出现，这提示了是否细胞已在体内发生了老化。为了解决这个疑问，通过选用和检测与老化相关的生化指标的改变。其中广泛运用的是与老化相关的β-半乳糖苷酶，它在老化细胞中表达（图10.3）。这种方法虽然不完美，但我们确实能发现细胞已在体内发生老化（图10.9），但还是希望其他生化指标的发现与应用（见补充材料14◎）。

老化（不是简单地局限于人为培养细胞）是一种生理过程，这种可能性和所提出的假说在一些细胞经历一系列生理应激和体外培养而诱导出这种老化状态。而这种应激造成的老化与细胞复制过程中的老化很难区别。例如，缺氧（氧应激）、DNA破坏、相关癌蛋白的异常活化等。Ras蛋白的活化能引起一些细胞的老化（见补充材料，图6B◎）。

关于体内细胞老化现象的解释将有助于我们更好地理解肿瘤的发生发展过程。因此，在活体组织中出现了细胞老化的生理应激时，将对肿瘤的形成有着潜在的影响。相反，如果在人为的组织细胞培养中，大量老化细胞的出现，对肿瘤发病机理的解释却又不太可信。

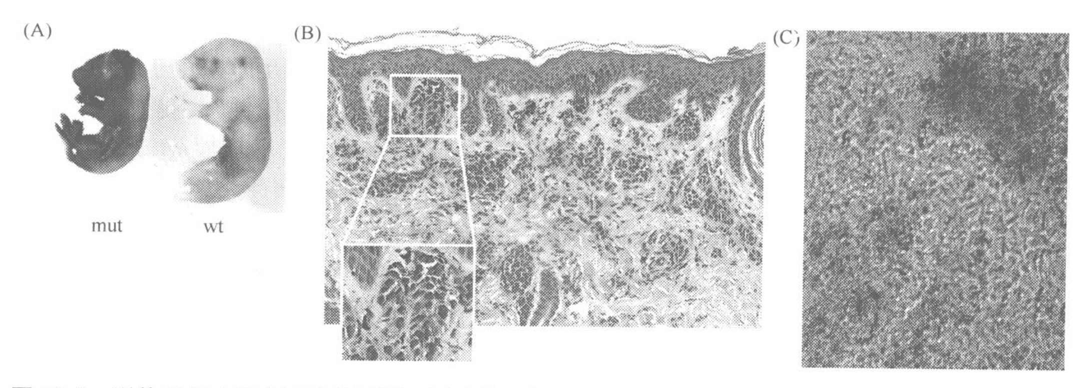


图10.9 活体组织中细胞衰老的证据，通过若干个实例展示体内老化细胞的存在 （A）获得*Brca 1*基因纯合突变小鼠胚胎，*Brca 1*参与维持基因组的完整性（12.10节），在这些胚胎的细胞中（突变型，左图），基因组DNA受到损伤，导致细胞出现衰老，通过检测与老化相关的β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）（显示蓝染，见图10.3），而在野生型胚胎中（野生型，右图）未见此类衰老细胞。（B）在老化的人痣的黑色素细胞中（痣为良性的胎记瘤），同样可检测到β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）为强阳性着色。（C）肿瘤化疗药物可以诱导肿瘤细胞衰老，显示一个肺癌患者活检组织中出现与图A一致的SA-β-gal阳性染色。患者在术前运用carboplatin和taxol类药物联合化疗，可见肿瘤组织中有SA-β-gal染色，而在正常的肺组织未见阳性标记。（A，from L. Cao，W. Li，S. Kim，S. G. Brodie and C. -X. Deng，Genes Dev. 17：201-213，2003；B，courtesy of D. Peeper；C，from R. S. Roberson，S. J. Kussick，E. Vallieres et al.，Cancer Res. 65：2795-2803，2005.）

10.4 染色体端粒长度与体外培养细胞的增殖能力

尽管转染大T抗原的成纤维细胞成功渡过衰老期（见10.8节），但仍未获得永生

化。又经过 10～20 代培养后，这些细胞开始出现老化，细胞群开始陷入危机期，表现为大批细胞发生凋亡。即使用能够使 p53 功能失活的 SV40 大 T 抗原也不能使处在此期的细胞逃脱凋亡的命运。

老化的细胞虽能存活一段时期但已停止增殖并出现由应激反应诱发的细胞凋亡（图 10.10），多数老化细胞具有相对稳定的染色体核型，但是应激损伤细胞的染色体核型相当不稳定。

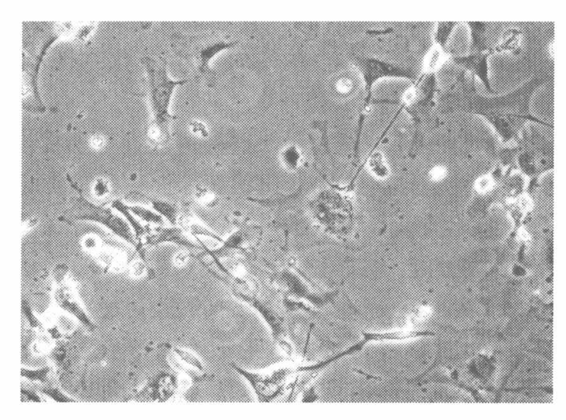


图 10.10　细胞应激与凋亡　凋亡是细胞应激的主要表现形式，大多数细胞破裂成为碎片（白点），因为群体细胞的应激是不同步的，所以仍有一些细胞相对正常（右上）。(Courtesy of S. A. Stewart.)

从细胞进入应激状态的时间和表现提示可能存在另一种与衰老不同的调节机制，这种机制可能与细胞的染色体 DNA 有关。与诱导细胞衰老的机制不同，可能有一种与细胞应激相关的分子起作用，从而能够展示胚胎早期细胞谱系所经历的增殖与分裂。

一般而言，染色体 DNA 不太可能成为哺乳动物细胞的“世代钟”。我们已经清楚了解 DNA 结构相当稳定，因此在细胞分裂复制过程中不会改变。相反，作为世代钟的分子，必须处于持续的变化中，而且这些变化在细胞的世代增殖中被记录下来。那么稳定的染色体 DNA 分子是如何记录细胞每一次增殖分裂的呢?

每条哺乳动物的染色体都携带一条线性的 DNA 分子。通过 DNA 转染技术的实验发现，DNA 分子的末端存在严重的缺陷（见 4.2 节）。线性 DNA 分子一旦导入细胞，通过多种核酸酶和 DNA 连接酶的作用，其末端迅速发生融合，这些酶在大部分哺乳动物细胞中都有活性。因此，线性 DNA 在细胞中本来就不稳定，然而，染色体中的线性 DNA 分子却能长期保持不变。

位于染色体末端的**端粒**（图 10.11）可以解释这些线性 DNA 是如何与细胞中的 DNA 修饰酶稳定共存。端粒扮演着阻止染色体末端融合的角色，这样防止了染色体之间彼此融合。实际上，端粒就像鞋带末端的带扣一样，在染色体末端形成一道保护屏障。如图 10.11 中所示，端粒功能的缺失将导致细胞应激反应。

在 1941 年芭芭拉·麦克林托克（Barbara McClintock）（图 10.12）在对玉米染色体的研究中首次发现，失去功能性端粒后，相应的染色体末端迅速融合，产生的巨大染色体含有两个或多个着丝粒，这些着丝点是染色体上的特殊结构，在有丝分裂过程中附着在纺锤体上。图 10.11B 显示了一种融合后的极端形式，细胞内所有染色体最终融合成一个巨大染色体。

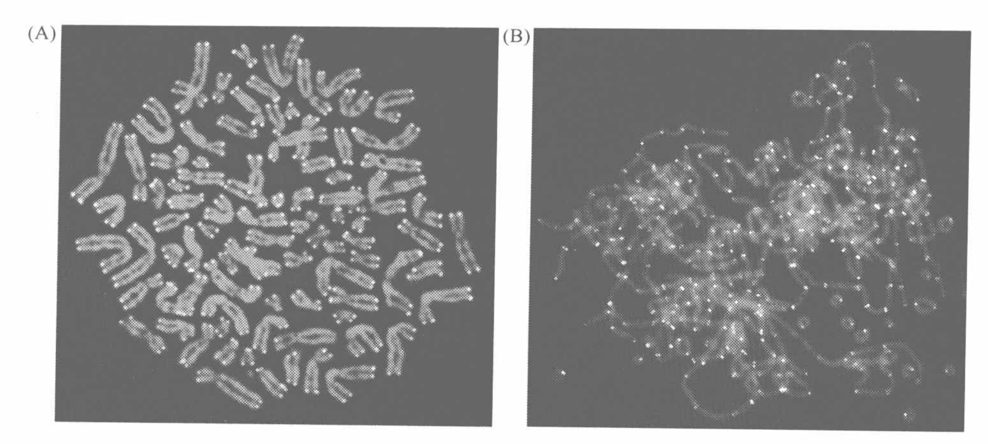


图 10.11 荧光原位杂交（FISH）显示端粒缺失 通过荧光标记的能识别端粒 DNA 重复序列的探针，利用 FISH 技术能够检测端粒。(A) 显微镜下显示，利用微管拮抗剂将细胞阻滞在分裂中期，可见染色体高度浓缩（红色），标记的探针可以清楚地检测到端粒（黄绿色点），每一个染色单体两端含有端粒，因为细胞处于分裂中期，复制后的两条成对染色体还没有分离。(B) 与图 A 的细胞核型进行比较，发现在这些细胞中维持端粒正常结构的关键蛋白 TRF2 失活（图 10.19），端粒失去保护功能，导致所有的染色体末端与末端融合，从而形成一个巨大的染色体。(A，courtesy of J. Karlseder and T. de Lange；B，from G. B. Celli and T. de Lange，Nat. Cell Biol. 7：712-718，2005.)



图 10.12 Barbara McClintock 通过对玉米染色体的仔细研究，她发现了染色体末端的特殊结构——端粒，它可以防止染色体末端之间相互融合。这项工作，加上由她首先发现的玉米基因组中的可跳跃的遗传成分，即转座子，使她荣获 1983 年诺贝尔生理学或医学奖。(Courtesy of American Philosophical Society.)。

端粒 DNA 由 5′-TTAGGG-3′六核苷序列组成，串联重复上千次。这些重复的序列，结合相应的蛋白，形成有功能的端粒。正常细胞中的端粒 DNA（端粒）在细胞周期的分裂增殖中呈渐进性缩短，最终不能有效保护染色体末端（图 10.13），从而导致细胞应激，染色体融合和凋亡。因此，端粒缩短从功能上标志着细胞的增殖过程并记录了从胚胎早期祖细胞至此经历了多少次增殖分裂。这一点，我们在后面的章节中将详细叙述。

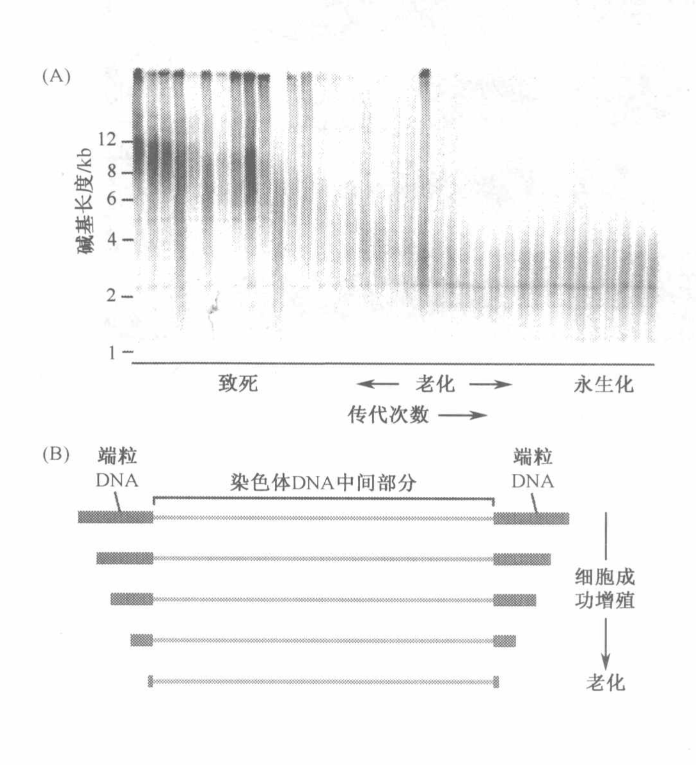


图 10.13 端粒 DNA 长度与细胞增殖能力相关 (A) 对非永生化的淋巴细胞群进行端粒 DNA 的长度测量。在每一次细胞传代时，取出一部分分析端粒 DNA 的长度，这个阶段细胞经过了 3～6 次的倍增（PD）。她研究的方法是通过用一些不能剪切端粒 DNA 中的重复序列 TTAGGG 的限制酶对基因组的 DNA 进行酶切，来检测端粒 DNA 长度改变。酶切之后留下的是含端粒 DNA 六核苷重复的高分子质量的基因组 DNA 片段。随后进行凝胶电泳，端粒限制片段的长度（TRF）可通过六核苷重复序列的特异性的探针进行 Southern 杂交分析。因为在同一个细胞，不同染色体中端粒长度不尽相同，不同细胞之间，端粒 DNA 更是迥然不同，导致同一样本中端粒长度高度异质性。分析显示，在非永生化的淋巴细胞中，随着细胞传代，TRF 逐渐变短（通常每一代减少了 50～100 个碱基对）。当 TRF 的长度小于 3kb 时，细胞进入应激状态，随后，有些细胞度过应激反应期获得永生化，此时的端粒 DNA 稍长于应激期。（B）模式图显示，端粒 DNA（红色）在周而复始的细胞生长分裂过程中持续缩短，直到失去了保护末端染色体的能力，端粒的缩短促使细胞进入应激状态（事实上，我们不清楚端粒 DNA缩短到什么程度才能产生细胞应激）。需要注意的是此图并不是完全按比例绘制的：端粒 DNA 通常含有 5000～10 000 个碱基对（bp），而染色体 DNA（蓝色）通常有数千万个碱基对（bp）。（A，from C. M. Counter，F. M. Botelho，P. Wang et al.，J. Virol. 68：3410-3414，1994.）

当细胞进入应激状态，起初的染色体末端与末端融合的事件通常发生在同一条染色体的两条姐妹染色单体之间（图 10.14A）。成对的染色单体出现在 S 期之后的 G_2 期，介于 M 期之前，这时，从亲本的染色体中产生的两条染色单体彼此还没有分离（图 8.3）。融合更倾向于发生在姐妹染色单体末端（而不是两条不相关染色体末端融合），这至少有两个方面的原因：①两条姐妹染色单体，由共同的着丝粒相连，彼此末端在空间位置更加贴近；②由于未知的原因，不同染色体的端粒 DNA 的缩短速度不同。因此，两条同源染色体的端粒 DNA（如人类 9 号染色体的染色单体长臂末端上成对端粒），在 DNA 复制时重新合成，拥有同样的分子结构，因此，如果一条染色单体的端粒末端缩短、损伤或部分发生融合，它的另一条姐妹染色单体也会处于同样状态。

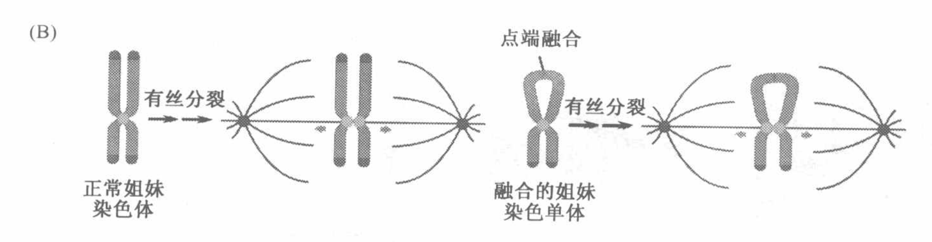
在随后的有丝分裂中，这些融合的染色单体的两个着丝粒随着纺锤体的迁移而向相反方向移动，造成分裂后期的间桥连接，与大范围的端粒破坏时看到的状态一致（图 10.14B）。有丝分裂的动力作用最终使得染色单体在两个着丝粒之间某处随机断裂（图 10.14C），这将会产生两个新的裸露的染色体末端，均不含着丝粒。这种未保护的末端很容易与另一个末端或其他不同源染色体的裸露末端发生融合。

(A)

未受保护的染色体末端

末端-末端融合

端粒破坏



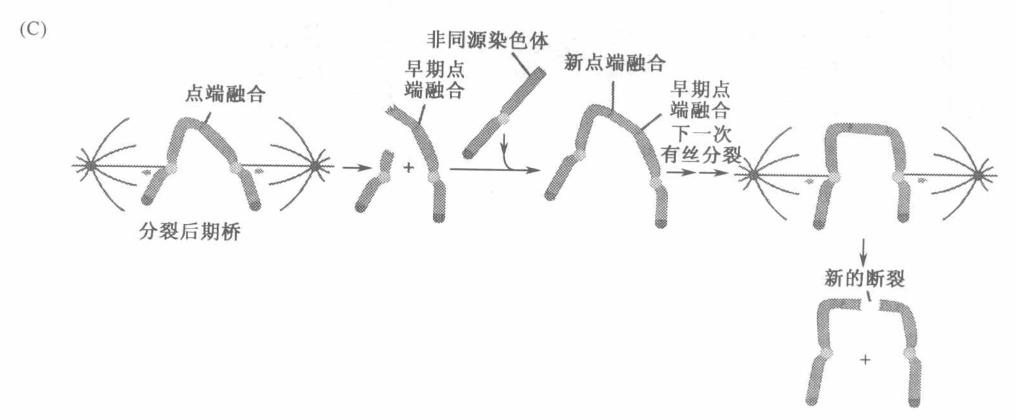


图 10.14　染色体断裂-融合-桥连接机制　(A) 当端粒（红色）变得太短而不能保护染色体末端 DNA 时，染色体发生断裂、融合、形成桥状连接。图中显示 G_2 期染色体的结构。它的两条染色单体靠共同的着丝粒附着在一起（绿色）。如图可见那些短臂端粒破坏之前，长臂上的端粒已被破坏。两条刚在 S 期完成复制的长臂的末端均受到破坏。在两臂的末端，因着丝粒而使彼此更加接近，彼此融合，形成具有两个端粒和两个着丝粒的染色单体。(B) 在正常的有丝分裂过程中，姐妹染色单体沿着丝粒向相反方向牵拉，定位于由两极发出的有丝分裂纺锤体（左）。同样，纺锤体将向两极牵拉，而未觉察到通过染色单体的长臂发生作用。(C) 正常的成对染色单体分裂时，分离彻底并且接近两个着丝粒，双着丝粒染色体分离与此不同，在分裂后期的两极间形成一个桥状连接。结果，双着丝粒的染色体将会在薄弱点凌乱地断开。在下一个细胞周期中，较大的缺乏端粒的片段染色体（蓝色），最终，双着丝点染色体在某个薄弱环节被撕裂。在下一个细胞周期，这个一端没有端粒的大片段将与另一个没有端粒的染色体末端融合（浅褐色），从而形成一个新的含有双着丝粒的染色体，在随后的有丝分裂中又被拉断，导致再一次的断裂、融合和桥连接的循环（未显示第一次断裂循环产生的较短染色单体片段）。

没有着丝粒的染色体末端与另一染色体末端融合，结果形成含双着丝粒的新染色体，这种新染色体的命运更是不容乐观（图 10.14C）。通常，一种情况是两个着丝粒不发生断裂而被拉向同一个方向，朝着即将形成的有核的子代细胞中移动。另一种情况是，这种染色单体的两个着丝粒分别附着在两个纺锤体上，被牵拉到细胞的两级。在有丝分裂后期染色单体彼此分离（像姐妹染色单体的早期），第二种情况下染色单体彼此分开，形成端粒缺失的染色体末端，使染色体受到损伤。

因为这将使这种新的断裂末端再次引起异源的染色体发生融合，产生更多的双着丝粒染色体，随后在下一次分裂又发生断裂。这种时序上的变化称断裂-融合-桥（BFB）循环，它以后期双着丝粒染色单体的断裂起始，随后没有端粒的染色单体与其他单体融合，通过融合又形成新的双着丝粒的后期桥（图 10.15）。一旦导致 BFB 的恶性循环将使细胞内的多条染色体核型发生紊乱，这一观点早在 1941 年 McClintock 就提出了。

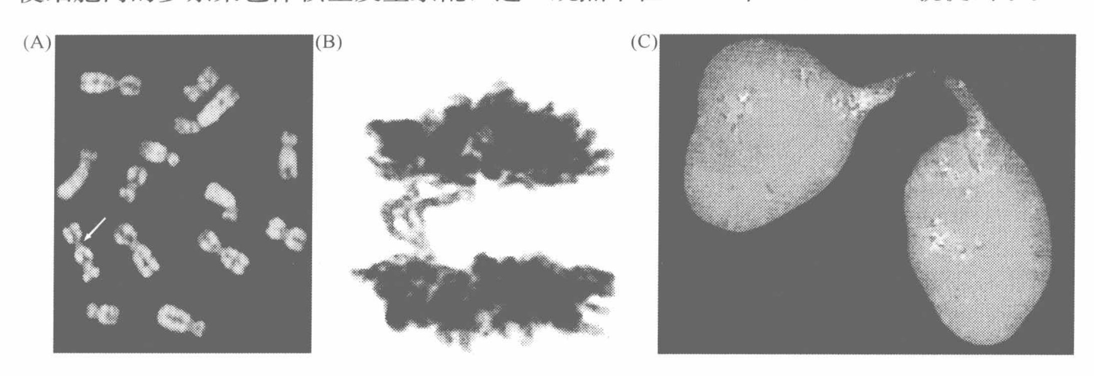


图 10.15 双着丝粒染色体后期桥和核间连接 （A）来自人胰腺癌细胞系分裂中期的双着丝粒（箭头所示）染色体，着丝点染成粉色。（B）像这样的含有双着丝粒的染色体通常导致分列后期桥连接的形成。我们能在人恶性皮肤纤维组织肉瘤中观察到，两组相对的染色体不能彼此正确分离，因为染色体被多种后期桥连着。这样的后期桥（见图 10.14）为此类细胞染色体的断裂、融合和连接提供了明确的证据，并不再保留足够的端粒。（C）当大量后期桥在有丝分裂末期或在胞浆分裂时发生断裂，仍有一些处在分裂间期的细胞，如人脂肪瘤细胞中子代细胞的细胞核通过染色质桥而进行连接。（From D. Gisselsson，L. Pettersson，M. Hoglund et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97：5357-5362，2000.）

确凿的证据证明端粒与细胞应激直接相关：进入应激期的细胞核型的紊乱程度与染色体端粒缺失时的情形十分相似。然而，在这些细胞中融合的染色体的端粒特别短，甚至缺失。这些现象表明一个问题，即引发细胞应激的分子机制存在于染色体的端粒中。

10.5 端粒分子结构的复杂性及特点

自 1980 年中期，人们逐步揭示了端粒及其 DNA 的分子结构。早期认为，在哺乳动物细胞或后生动物的细胞中，端粒由一些重复的六核苷酸序列组成，其中一条链上为 5′-TTAGGG-3′（富含 G），互补链上为 5′-CCCTAA-3′（富含 C）。在正常人体细胞中，端粒 DNA 包含数千个重复的六核苷酸序列，在染色体末端形成 5～10kb 的重复序列。

哺乳动物细胞乃至所有真核细胞的端粒 DNA，含有一种附加的特殊结构：富含 G 的链多出一百至几百个核苷酸，导致 3′单链端外挂（图 10.16）。这种凸出的链中含有特殊分子构型——**T 环**。在 20 世纪 90 年代后期通过电子显微镜来分析端粒 DNA 时常常观察到一种环形结构，实质上是套索结构（图 10.17A）。这种构型的形成依赖于三链 DNA 复合体的形成（图 10.17B 和图 10.17C）。在所有端粒 DNA 的末端含有 T 环，但

可能由于技术方面的问题，只在少数端粒中能观察到。电子显微镜观察下不能识别这种结构。T 环有助于保护线性 DNA 分子的末端，因为单链末端的外悬区被巧妙地塞进双链区域，以保护其免受损伤。

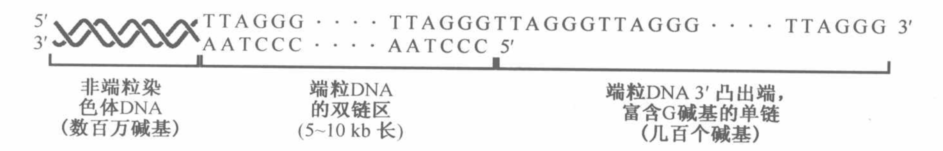


图 10.16 端粒 DNA 的 3′端凸出，含 G 富集的端粒 DNA 链为粉色，延伸出 C 富集链为蓝色。形成 3′黏性末端（右图），多出几百个核酸酸，凸出的 3′端远短于端粒 DNA 的双链（左图）。端粒 DNA 通常为 5000～10 000bp（此图未显示全部）。

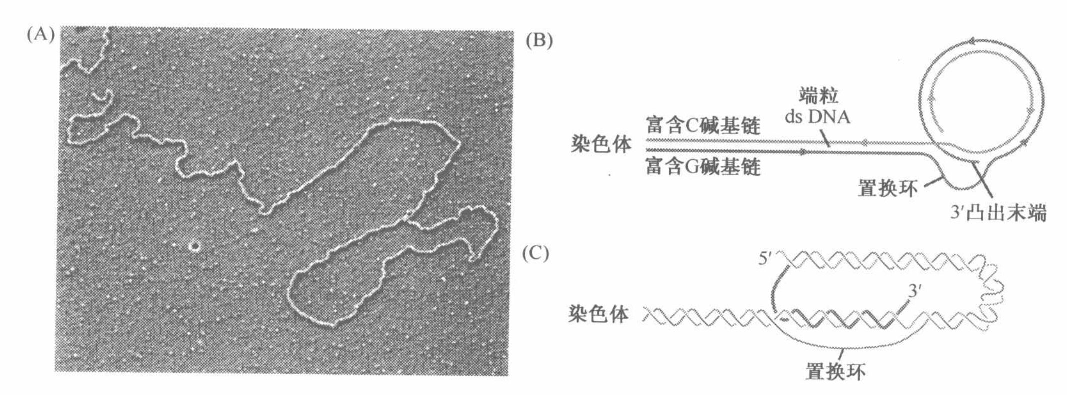


图 10.17 T 环结构 （A）从小鼠细胞中提取纯化的端粒 DNA（通过化学的交联作用保持双链结构的稳定性），在电子显微镜下显示染色体末端有一种套索结构——称为 T 环。（B）T 环的示意图显示了 3′端凸出的 G 富集链（粉色）与 C 富集链（蓝色）上的小段区域退火形成置换环（粉色链）。图中箭头方向为 5′→3′。（C）图中再次显示了 T 环，3′凸出末端伸入染色体形成双链螺旋，在图中用粗线标明（粉色）。（A，from J. D. Griffith，L. Comeau，S. Rosenfield et al.，Cell 97：503-514，1999.）

在相对较长的双链端粒 DNA 和相对较短的外悬末端都能与特定蛋白相结合。以此推测，一些蛋白中含有特异识别并结合六核苷酸序列的结构域，它们与端粒 DNA 的双链和单链区结合（图 10.18）。端粒结合蛋白和端粒 DNA 结合在一起构成的核蛋白复合体就称之为端粒（图 10.19）。

在细胞周期的 S 期，复制驱动能高效地复制线性 DNA 分子中间的序列，即染色体的主体部分，但复制染色体末端序列是极其困难的。关键之处在于所有 DNA 链的合成必须从现成的 3′羟基末端开始，以类似**引物**来延伸核的 DNA 链。或者，如没有可用的 DNA 引物，可以以 RNA 分子的 3′端作为 DNA 合成的引物（图 10.20）。

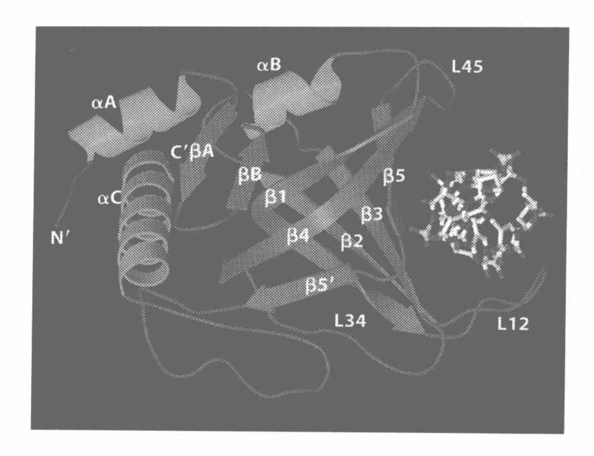


图 10.18　端粒相关蛋白结构模型　除了已介绍过的复合体结构外（见图 10.17），端粒 DNA 还通过与一系列相关结合蛋白结合防止被降解。图中显示结合蛋白中的一种，Pot1 的丝带状空间结构（Z-螺旋，13 条褶状折叠，一些环）。Pot1 能与单链和双链的端粒 DNA 结合，这样利于稳定端粒结构。右图中显示了 Pot1 与单链端粒 DNA 结合的状态。(Courtesy of M. Lei.)

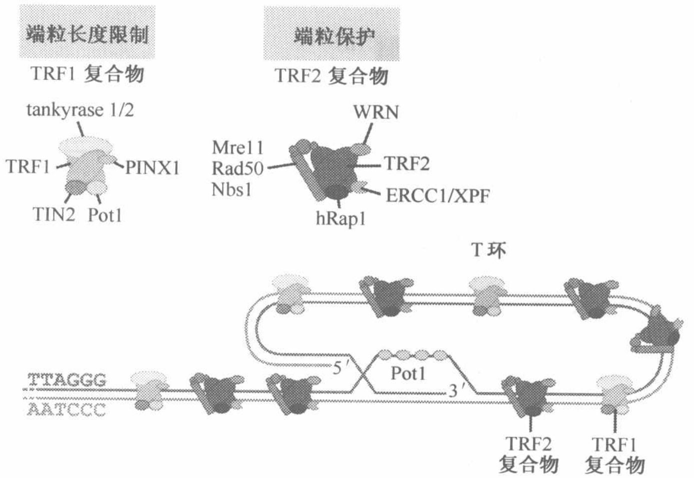


图 10.19　多种端粒特异性蛋白结合在端粒 DNA 上　Pot1（图 10.18）只是已知的众多端粒特异性结合蛋白中的一种。其稳定端粒的具体机制有待进一步研究。目前发现至少有两种特异的蛋白复合体均与端粒 DNA 的双链区域结合。值得注意的是，含有 TRF2 的复合体中含有一些已知蛋白，它们参与基因组的损伤修复，其中相关内容将在第 12 章论述。Pot1 也能够与富含 G 的单链末端通过置换而形成的 T 环结合（见图下中部所示）。(From T. de Lange, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5:323-329,2004.)

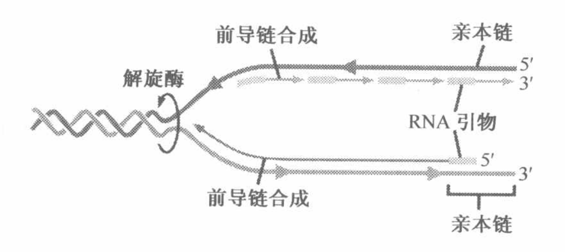


图 10.20　引物和 DNA 合成反应　在 DNA 复制过程中，左侧亲本的双螺旋 DNA 在解旋酶作用下解开，使得复制过程持续向左进行。新合成的滞后链（上部）由短的 RNA 引物片段引导（绿色方块），引物合成酶将这些 RNA 引物按数百个核苷酸的间隔依次安置。RNA 分子的 3′羟基末端作为新合成子链的起始（浅蓝色标记），因为合成按 5′→3′方向，所以滞后链的合成与延伸的方向与复制叉相反。另一个亲本链的复制（见下部）均由一种 RNA 引物（绿色标记）引导，能够连续进行复制，随着亲本链的解旋向 3′端延伸。但是，起始“前导链”的 RNA 引物远离亲本链的 3′端（蓝色标记）；此外，RNA 引物自身随着 DNA 合成结束后开始逐渐降解，因此，作为前导链的合成，导致了亲本链之一未完成复制（蓝色标记，底部右侧）。

以模板链 3′端之前某处合成一段引物，在使用于合成短链 RNA **引物合成酶**作用下进行前导链的合成（图 10.20），DNA 聚合酶将以 3′端互补的一部分序列模板启动 DNA 新链的合成。（即使引物合成酶能够互补并以模板链的末端合成 RNA 引物，但在新合成的子代链中仍缺失大约 10 个核苷酸，相当于 RNA 引物的长度，因为 RNA 引物完成起始 DNA 延伸后就被降解了。）

末端复制的问题可以解释正常细胞每一次分裂后端粒 DNA 缩短。端粒 DNA 末端没有复制，此外，细胞中的核酸外切酶对端粒 DNA 末端复制的延缓，最终导致端粒的破坏。无论何种原因，在许多类型的正常人细胞中，细胞每分裂增殖一代端粒将会失去 50～100 个碱基（见图 10.13）。这种对端粒 DNA 的持续性破坏是限制细胞传代能力的分子机制。

可以想象，在人类的胚胎细胞中，初始的端粒 DNA 相当长，为 8～10kb。随着机体发育过程中不同的细胞谱系在进行着增殖分裂的周期循环，端粒 DNA 也在此过程中逐渐缩短。最终，在一些细胞中端粒 DNA 的长度过短以至于不能保护染色体末端 DNA。随之发生断裂-融合-桥的恶性循环（BFB 循环），以至于染色体随机易位融合（见图 10.14）。事实上，因为细胞增殖能力的丧失，而使组织细胞步入老化状态，这种复制能力的丧失归结于端粒的破坏。这种解释似乎合理，但是我们还不知道如何利用端粒长度预测细胞断裂-融合-桥的恶性循环［BFB 循环和应激反应（信息栏 10.3）］。

信息栏 10.3　端粒 DNA 长度变化不能确切预测复制潜能　即使知道了端粒 DNA 的平均长度，仍不能精确预知细胞在进入应激状态之前增殖分裂了多少代。有些细胞上的端粒缩短速度快于其他细胞。因此，按木桶效应，在细胞中最短的端粒可能决定它的复制能力，因为这些端粒决定细胞何时进入断裂-融合-桥的循环，引发应激反应。甚至，我们不清楚端粒 DNA 短到何种程度开始失去其保护功能。在某些情况下，即使端粒 DNA 还有几 kb，也不能降低 DNA 末端与末端发生融合的能力。

这些间接的证据表明可以通过端粒的缩短来限制细胞的增殖潜能，以阻止癌细胞的增殖。然而，早期对这一问题认识是一个细胞克隆要获得致癌性突变（包括癌基因的激活和抑癌基因的失活）并逐渐发展成为临床可检测到的占位性病变，很可能与端粒的异常有关。

10.6　端粒酶表达与早期肿瘤细胞应激反应

在体内利用具有癌前病变行为的细胞进行研究是困难的，所以我们不得不依赖体外培养来推论，如人成纤维细胞。前面提到，若通过 SV40 的大 T 抗原（癌蛋白的表达）使细胞避开衰老，它们可以继续进行 10～20 代增殖，而后，开始步入应激状态。偶尔，有一小群细胞自发地从大量处于应激期的细胞中存活下来（克隆）。这些变异的细胞克隆——可能源于千万个应激细胞中的一个，具有继续生长和无限增殖的潜能（见图 10.13A）。最终获得永生化，而这个结果似乎是随机的事件。

这种在体外培养的细胞中观察到的现象，似乎可以概括体内癌前细胞群的行为。所以，体内、体外这两类细胞群进入应激状况或迟或早，均经历了许多代的增殖和伴随着

端粒结构的破坏，这个过程中可能产生极少数的永生化细胞，使其自身能够克服端粒缩短带来的后果。

这些处于应激状态的细胞群体如何面对和克服端粒缩短所带来的后果？一般而言，应激和端粒缩短对细胞是不可避免的事件。然而进一步分析发现细胞永生化途径比较明确，细胞能够通过重建端粒并渡过应激期，改变了其控制缩短端粒、抑制增殖并促进细胞老化应激的分子表达模式。

端粒重建是通过端粒酶的作用而完成的，**端粒酶**能特异地延长端粒 DNA。一个惊人的发现是通过端粒重复序列检测法（telomeric repeat amplification protocol，TRAP）进行检测，在近乎 85%～90%的人肿瘤细胞样品中都能检测到端粒酶的活性，而在正常细胞中水平很低（图 10.21）。低水平的端粒酶活性，虽然能最低限度地维持端粒 DNA 的稳定（见信息栏 10.4），但不能阻止每一次正常细胞周期复制传代过程中端粒的进行性损害。

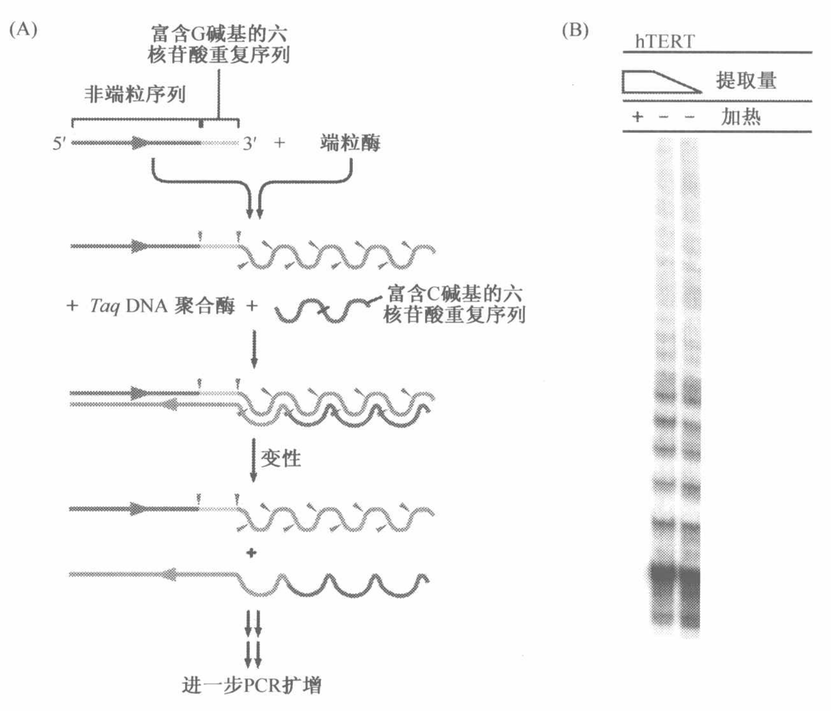


图 10.21 端粒重复序列检测法 （A）端粒 DNA 重复片段扩增方法，依赖聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）来扩增端粒酶的产物，在细胞的裂解产物中检测端粒酶活性。将非端粒序列引物（粉色）和端粒的六核苷酸重复序列引物（G 丰富链，浅绿色显示）在 dNTP 存在的情况下加入细胞抽提物中。细胞抽提液中可能存在可被端粒酶延伸的引物（浅橘黄）。随之加入耐热的 *Taq* 聚合酶和具有 C 富集的引物（深绿），延长第二条链（浅蓝），然后对获得的这两种 DNA 进行再变性，在特定引物存在的状态下进行 PCR。（B）通过凝胶电泳来分析 TRAP 的反应结果：DNA 分子之间相差 6 个核苷酸。在阴性对照中，仅对细胞裂解液适当加热，使细胞中的端粒转移酶变性失活（第一步）。这一步需要确定除端粒酶之外，体系中是否存在耐热的 DNA 聚合酶。实验中，转染 hTERT 基因真核表达载体的应激前细胞，它是端粒酶的催化亚基，能诱导高水平的端粒酶活性，并很容易在细胞提取物中检测到高水平表达（第二步）和低水平表达（第三步）。（From M. Meyerson，C. M. Counter，E. N. Eaton et al.，Cell 90：785-795，1997.）

信息栏 10.4　正常人细胞中低水平表达端粒转移酶　曾经一度认为在人肿瘤细胞中端粒转移酶高水平表达而在正常细胞中不表达（图 10.21B）。事实上，在 TRAP 分析之前，通过单克隆抗体来做免疫沉淀。发现在正常细胞中检测到端粒酶活性，在细胞进入 S 期的短期内可检测到端粒酶的瞬间表达，而后在 G_2 期消失。这种少量的表达能修复端粒末端的 T 环（见图 10.17），但在全长端粒 DNA 的维持或延伸方面没有任何作用，后者主要取决于双链区。但这些实验不能明确回答为何正常组织中的干细胞有明显的端粒酶表达，而在其分化的后代细胞中不表达。

在成人正常细胞中，在一些特殊细胞中能观察到低水平的端粒酶活性。例如，在睾丸的精子细胞中存在确定的端粒酶活性，在功能性活化的淋巴细胞也存在一过性表达。

已有的证据表明，在早期胚胎的发生过程中表达端粒酶，而在随后细胞分化形成的机体组织中消失。所以在早期鼠胚胎和牛胚胎发生过程中，端粒酶在胚泡期和桑葚胚期的细胞中表达，之后随即消失；很可能在人类胚胎发育中有类似的情形控制端粒酶的表达。相应的在人体大多数细胞中虽然含有端粒酶的全基因序列，却因不能适量表达此基因而不表现出该酶的活性。

但是，在大量体外培养的细胞进入应激期时，仅有少数变异细胞能够解除抑制表达相应的端粒酶，从而获得成套酶的高水平表达，促使端粒 DNA 延长，使得细胞进一步增殖。事实上，只要它们的后代（子代细胞）能持续表达这种酶，将会持续增殖乃至被认为获得了永生化。当癌前细胞群进入应激时，我们假设这些细胞在体内也会经历类似的事件，产生永生化的变异体，成为之后形成的大量癌细胞的祖细胞。

端粒酶的早期研究是基于对面包酵母遗传分析和对纤毛虫进行生物化学提纯（见补充材料 15 ◎）。它是由数个特殊的亚基组成的复合酶，一些亚基功能还不清楚。哺乳动物细胞端粒酶**全酶**的中心由两个亚基组成。其中一个亚基为 DNA 聚合酶，还具有一些特殊的反转录活性，其功能类似于反转录酶病毒（3.7 节）及各种其他病毒和转座子中

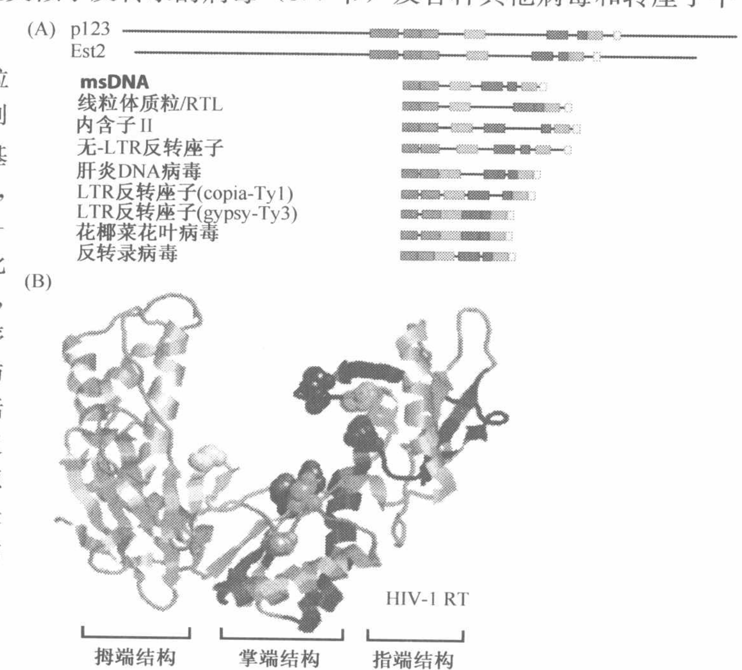


图 10.22　端粒酶的催化亚基　(A) 确定 *E aediculatus* 的端粒全酶中催化亚基的氨基酸序列（见补充材料图 7 ◎）使编码基因得以克隆，最初命名为 p123，这个基因与 *Saccharomyces cerevisiae*（酵母）端粒酶全酶的催化亚基 Est2 同源（命名为 Est2，ever-shorter telomere）。具体的序列分析揭示了这两个催化亚基与多种反转录转座子、病毒、包括 HIV 在内的反转录酶、病毒的反转录酶，在催化片段上具有同源关系。(B) 显示与 HIV 反转录酶（HIV-1 RT）同源的三维结构区域。（From T. M. Nakamura, G. B. Morin, K. B. Chapman et al., Science 277:955-959, 1997.）

的酶，以 RNA 为模板来合成 DNA（图 10.22），但是，与其他反转录酶不同，端粒酶巧妙地组装自身的 RNA 模板组成第二个基本亚单元。由 451 个核苷酸长度的 RNA 分子的一小部分作为模板来指导全酶的反转录活性。

从对端粒酶蛋白的固有结构分离得到决定催化亚基的氨基酸序列，随后，依次克隆纤毛虫和人类该同源基因的编码区。人类细胞的催化亚基称 hTERT（human telomerase reverse transcriptase），合成与端粒相关的 RNA 分子六核苷酸互补的 DNA 分子（hTR，它编码的基因有时称为 TERC），并将其连接到端粒 DNA 原有的富含 G 的 3′外悬末端（图 10.23），互补链推测由常规的 DNA 聚合酶合成。

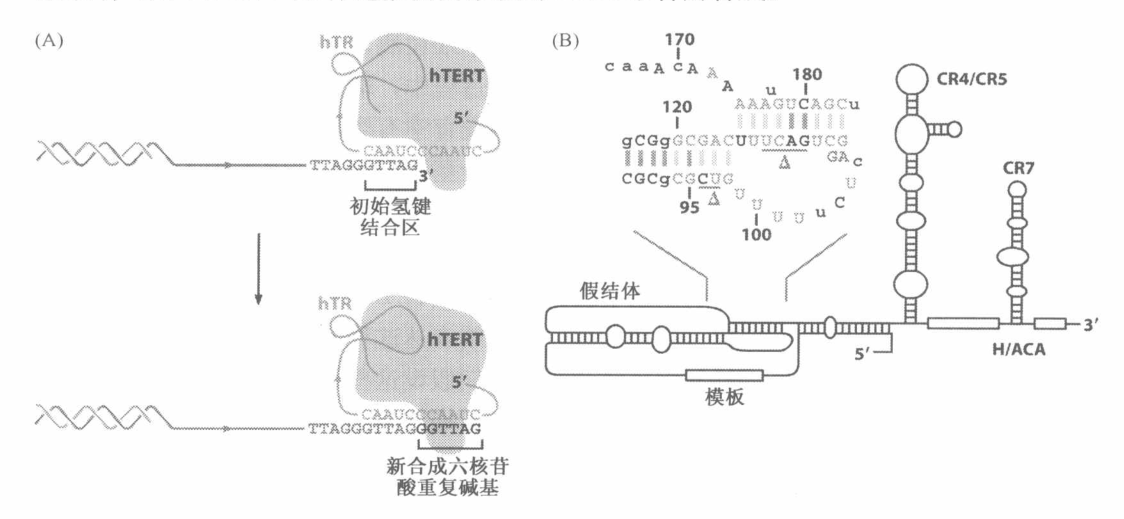


图 10.23　人端粒酶全酶的结构　(A) 其至少包括两种必需的亚基，hTERT 催化亚基（浅棕色）和与之相关的 hTR RNA 亚基（蓝色）（至少还有其他 8 种亚基可能存在于全酶中，但还没有明确的答案）。全酶附着在富含 G 链的 3′端凸出末端（粉色），部分地通过 hTR 的氢键结合到富含 G 链的最后 5 个核苷酸。结果是，通过对 hTR 亚基序列的反转录，hTERT 能够以每次 6 个核苷酸形式使富含 G 链延伸（黑色）。通过这个过程的重复，该酶能在富含 G 链上延伸成百上千个核苷酸。箭头方向为 5′→3′。(B) hTR 分子仅由 451 个核苷酸组成。在其中心是一个假结体，这是一种拓扑结构（蓝色字母），其他特征除外，它含有三链螺旋结构。涉及端粒酶功能的序列突变，包含碱基替换或缺失时（△），将引发病理状态。(B，from C. A. Theimer，C. A. Blois，and J. Feigon，Mol. Cell 17:671-682,2005.)

从早期假定的描述中我们可以预测，人细胞在进入应激之前，原本端粒酶呈阴性表达，hTERT mRNA 表达水平低至不可检测。然而，当有极小部分永生化的变异细胞渡过应激期，其后代通常表达高水平的 hTERT mRNA，并发挥端粒酶活性（图 10.24）。这一现象直接说明渡过应激期的细胞伴随着对 hTERT 基因的活化。

端粒酶活性的获得可能仅与逃脱应激状态相关而非原因。可以通过一个简单实验解释这种质疑：在细胞即将进入应激状态之前，转染 hTERT 基因的 cDNA，可诱导细胞端粒酶活性并促使已明显缩短的端粒得以延伸，阻止细胞进入应激状态从而使细胞永生化（图 10.25）。

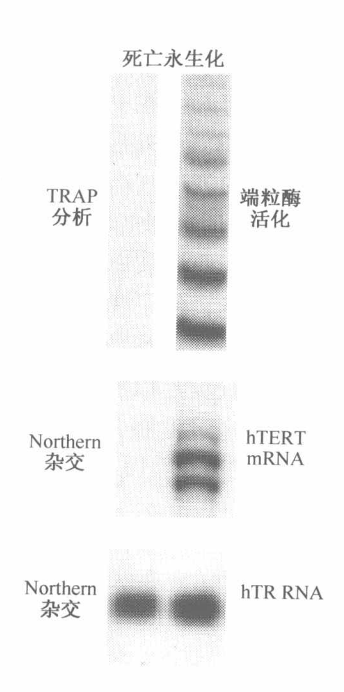
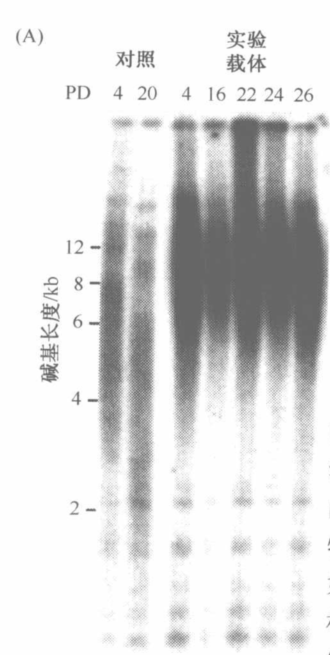


图 10.24 细胞应激与端粒酶活性 淋巴细胞群中有极少数个体的B淋巴细胞能避开应激，启动增殖生长，随之进入永生化状态（见图 10.13A）。如上图所示，应激前的细胞缺少端粒酶活性，而通过 TRAP 方法可得知（图 10.21）自发永生化细胞表现高水平的端粒酶活性。在应激前细胞中表达缺少编码端粒全酶的催化亚基的 hTERT mRNA 却出现在永生化细胞中（中间）。然而，作为 hTERT 延伸端粒 DNA 模板 hTR RNA 的水平仅有轻微上升（图 10.23B，底部），从而表明在细胞中的 hTERT 表达水平决定了该酶的活性。(From M. Meyerson, C. M. Counter, E. N. Eaton et al., Cell 90: 785-795, 1997.)



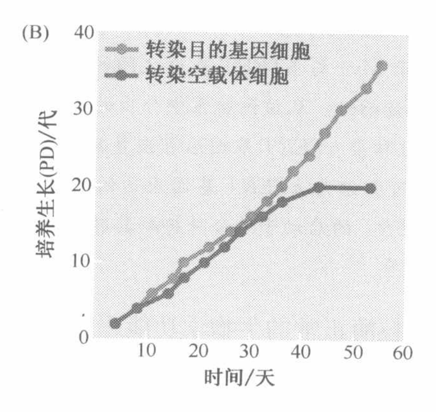


图 10.25 端粒酶的表达与细胞老化 （A）Southern 杂交分析检测端粒 DNA 的长度：首先利用不能识别端粒六核苷酸重复序列的限制性内切核酸酶消化基因组 DNA（见图 10.13A），然后以特异性识别六核苷酸序列的 DNA 探针对酶切后的片段进行杂交。如图显示，在端粒酶表达阴性的人胎肾细胞中，用与端粒蛋白不相关的反转录病毒载体感染细胞，此时细胞的端粒会在第 4～20 代时缩短（左侧两条道）。然而，用含 hTERT 的反转录病毒载体感染细胞，使得端粒长度增加，并在 26 代后保持不变（右路）（因为此时的端粒更长，Southern 杂交分析产生很强的信号），以 Marker 大小为准，此时端粒长达几个 kb。（B）人胎肾细胞到 40 天进入应激状态，此时细胞大概经历了 20 代（PD 红线）。然而，hTERT 的异位表达（蓝色）使细胞获得了无限增殖能力。(Courtesy of C. M. Counter and R. L. Beijersbergen.)

这个实验的结果表明了三个基本观点。首先，端粒酶的全酶可能由多个特定亚基组成，在正常的应激前人细胞中仅仅缺失了 hTERT 基因编码的催化蛋白；端粒酶全酶的其他亚基，包括 hTR——端粒酶相关的 RNA 分子，在应激前细胞中都是足量存在的。其次，因为端粒酶的表达（而不是其他酶）使得细胞逃过应激，并且端粒酶特异地作用于端粒 DNA 上，表明应激的实质就是端粒快速缩短。最后，该实验显示端粒酶活性的获得，如在一些处于应激状态的细胞群中仅有极少数的变异细胞可自发地获得端粒酶活性，能使其避开衰老，使子代细胞获得永生化能力。

我们进一步推断端粒酶能使细胞成功避开应激是因为它改变了“世代钟”。端粒酶高水平表达使端粒长度足以进行无限增殖并使依赖于端粒持续缩短的“世代钟”逐渐失去作用。肿瘤细胞通过抑制 hTERT 的表达，从而获得了高水平的端粒酶活性，具体作用机制还不清楚（信息栏 10.5）。

信息栏 10.5　癌基因和抑癌基因在调控 *hTERT* 表达中发挥关键性作用　在肿瘤进展过程中，调控解除 *hTERT* 转录抑制的机制非常复杂，目前还并不清楚。有多种转录因子可作用于 *hTERT* 启动子。一旦 *hTERT* 转录被激活并可大量地合成 hTERT 蛋白，后者通过与端粒酶全酶的其他亚基结合，就足以产生高水平的端粒酶活性。Myc 蛋白作为转录因子，其作用是解除细胞周期的控制（8.9 节），它也可促进 *hTERT* 转录。在鼠和人的 *TERT* 基因启动子中至少有两个类似 Myc 蛋白转录因子 *bHLH* 的识别序列。

此外，通过实验可以显示 Myc 与 hTERT 表达之间的联系，如分离到的人恶性黑色素瘤细胞系中 Myc 高水平表达并具有致瘤性。从该细胞系中分出的三个不同克隆，其 Myc 表达水平降低了 8 倍并失去了致瘤性。但通过转染 *hTERT* 基因后可恢复其致瘤性。因此，这些细胞中 Myc 表达水平降低与致瘤性下降的关系可归结为 *hTERT* 基因表达的缺失。除 Myc 外，抑癌基因 *MEN1*（表 7.1）的产物 Menin 可与 *hTERT* 的启动子结合并抑制其转录。Sp1 转录因子也有类似的抑制作用，而 Sp1 的表达可受 TGF-β 诱导。

随着研究的深入，端粒酶正常的生物学功能逐渐明了。在单细胞的真核生物中，如纤毛虫和酵母，细胞的指数生长需要持续的高水平端粒酶活性以确保适当长度的端粒来维持染色体的稳定。通过延伸端粒 DNA，原生动物细胞中的端粒酶能够补偿端粒 DNA 受到的持续性损伤，这一点归因于强大的 DNA 复制驱动对 DNA 末端的延缓复制，因为单细胞真核生物不具备发生肿瘤的可能性。

复杂的后生动物，特别是人类的端粒酶表达活性有较大差异。由于在胚胎后期的细胞中端粒酶表达很大程度上被抑制，因而这些细胞在进入应激之前的增殖能力是有限的。这一作用机制可能是人体抗肿瘤防御体系的关键因素。

这种理论模型同样能对人类细胞如何能逃过衰亡而进入永生化提供令人信服的证据。但是，它无法解释另一个长期的未解之谜：端粒酶的表达如何使一些类型的培养细胞避免老化（信息栏 10.6）？

信息栏 10.6　端粒酶也影响着细胞的老化　以下事实表明：①生理应激的累积，包括组织培养的应激，影响着衰老的起始时间；②在衰老的细胞仍具有较长的端粒。然而，端粒酶对于衰老的起始似乎扮演着重要角色，在一定类型的细胞中很能说明这一点，如培养的人成纤维细胞，在进

入衰老之前如果表达 hTERT 将延缓其衰老的进程。

通过观察衰老细胞有可能回答这一难题，细胞进入衰老期时会损失端粒 DNA 末端凸出的单链，这种改变似乎是生理应激反应。结果导致端粒末端的降解，缺少了 T 环从而产生 DNA 损伤信号并诱导 p53 介导的细胞增殖活动的停滞，最终表现出衰老的特征（图 10.26）。通过保护凸出的单链端粒末端不被降解，hTERT 可以避免引发衰老。这个模型尽管仍需验证，但是意味着 hTERT 参与了端粒 DNA 凸出单链的维持，也能长久维持端粒 DNA 的双链结构区。

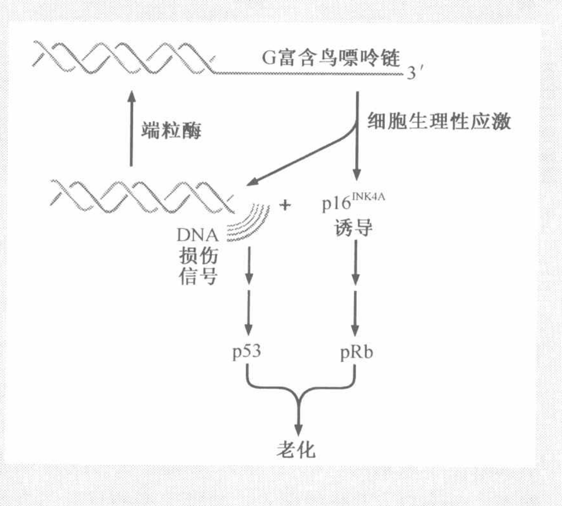


图 10.26　端粒酶的作用和应激性老化　模式图展示了人体细胞中端粒酶是如何表达调控（通过 hTERT 催化亚基的异位表达来获得），并防止细胞复制性衰老的推测。在此未显示正常存在于端粒末端的 T 环（图 10.17）。端粒 DNA 的富含 G 的凸出链（粉色，顶部）在细胞衰老后大量降解，表明这种缺失可能由于一定的生理应激引起，产生的平端端粒 DNA 进而释放 DNA 损伤信号可激活 p53。与生理应激引起的 $p16^{INK4A}$ 表达（8.4 节），共同促使细胞进入衰老的生长状态。通过逆转 G 富含链的缺失，端粒酶能够阻止一定类型的细胞，如人的成纤维细胞进入老化状态。

10.7　端粒酶在肿瘤细胞增殖中起重要作用

上述实验通过培养人的衰老前细胞，表明可检测到的端粒酶活性是大多数人肿瘤细胞获得永生化的主要原因，而这种永生化是肿瘤细胞持续性增殖的重要特性。这种理论模型通过抑制肿瘤细胞端粒酶活性的实验得到了证实。通过在端粒酶阳性的细胞中导入反义 RNA 能降低端粒酶活性。例如，用端粒全酶中 hTR RNA 亚基的互补 RNA（见图 10.23B）导入端粒酶阳性的肿瘤细胞中，这种反义分子可能与 hTR 分子退火形成 RNA-RNA 双链螺旋，从而阻滞了 hTR 亚基参与端粒 DNA 合成的能力。这种技术很难完全阻滞 hTR 的功能，尽管如此，这种 RNA 干扰实验成功运用在 HeLa 细胞上，转染反义 RNA 后 23～26 天细胞停止生长。

相比之下，另一种实验技术更有效，源于使用 hTERT 酶的突变体，在催化部位携带有氨基酸替代，这些置换导致酶的催化能力丧失。在端粒酶阳性的细胞中过表达时，hTERT 突变蛋白发挥显性失活作用（见 9.3 节），干扰细胞内源性端粒酶活性。dn hTERT（突变的 hTERT）比内源性 hTERT 蛋白的表达水平更高，因而可能专一性地结合端粒酶全酶的其他亚基。这样，当其他分子与 dn hTERT 蛋白结合，形成的端粒酶全酶是失活的。

在各种不同的端粒酶阳性的人肿瘤细胞中，dn hTERT 亚基的表达能引起端粒酶活性降低至难以检测到的水平，并能使细胞延迟一段时间后进入衰亡。在当导入 dn hTERT 后 5～25 天内细胞发生衰亡，具体时间取决于导入 dn hTERT 前细胞端粒

DNA 的长度。当原来的端粒长度为 2～3kb 时，细胞立即进入衰亡，而最初端粒 DNA 长度为 4～5kb 时，细胞经历 30 天甚至更长的传代时间才进入衰亡（图 10.27）。这些延迟反应预示着在 dn hTERT 导入肿瘤细胞后，端粒逐步缩短，当端粒 DNA 长度缩短到一定阈值时衰亡暴发。此时一系列的诸如癌基因激活和抑制癌基因的失活的结论可扩展到促进小儿肿瘤的研究（信息栏 10.7）。

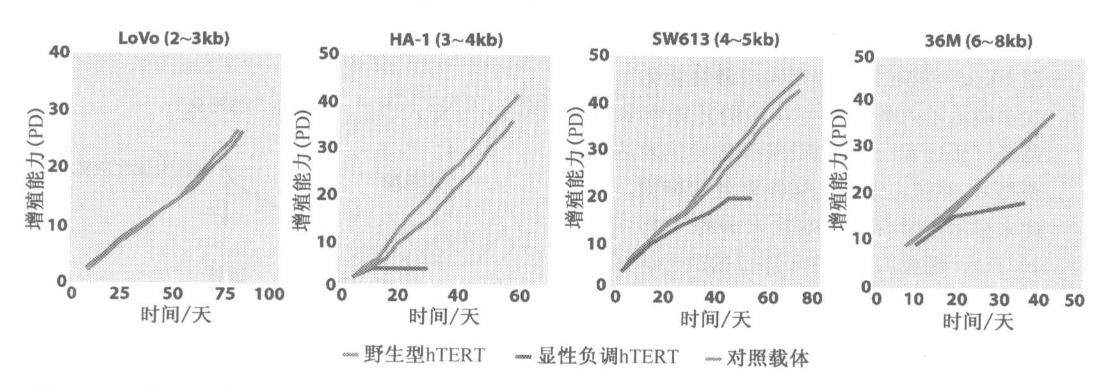


图 10.27 抑制端粒酶活性可导致肿瘤恶性增殖能力的丧失 通过载体导入显性负调 hTERT 蛋白的突变体（红线），野生型的酶（绿线）和一个空质粒载体（蓝线）在四种不同的人类细胞系有着显著的不同。它们各自的端粒 DNA 长度，均通过 TRF Southern 杂交（见图 10.13）的实验设计显示为数千个碱基对（kb）。导入空载质粒可允许细胞持续增殖，作为计算细胞的倍增代数（PD），然而，dn hTERT 酶的导入，与野生型的只有一个氨基酸的替代差别，却能导致细胞停止增殖。在不同的延迟时间（几天内），导入的 dn 质粒微观检验显示细胞停滞增殖，细胞进入衰亡状态并且出现大量凋亡细胞。在 LoVo 细胞系中（顶部左侧）表达 dn hTERT 酶后迅速进入衰亡，因而未能进行确切的细胞计数。（From W. C. Hahn，S. A. Stewart，M. W. Brooks et al.，Nat. Med. 5：1164-1170，1999.）

信息栏 10.7 端粒酶促进某些小儿肿瘤的生长 神经母细胞瘤是外周神经（交感神经）系统的肿瘤，常见于幼儿。这些肿瘤的预后不同，有的病例能自发好转，有的不断恶化，发展为侵袭转移，甚至造成机体死亡。前面章节（4.5 节）中提到这些肿瘤中经常有 N-*myc* 基因的扩增，N-*myc* 拷贝数高预示患者预后不良。端粒酶活性对于预测肿瘤的预后更有效。如图 10.28A 显示，神经母细胞瘤的患儿中其肿瘤组织端粒酶阴性（通过 TRAP 实验检测）的患儿对治疗反应良好，而端粒酶阳性的患儿预后不良。这两种基因 N-*myc* 和 hTERT 的表达可能有功能上的联系，因为 N-*myc* 同一家族的 *myc* 是诱导 hTERT 转录的调控因子（信息栏 10.5）。另一种常见的儿童肿瘤，Ewing（尤文氏）肉瘤，有着相似的发病基础，Ewing 肉瘤同样来源于周围神经系统的细胞（图 10.28B）。

某些病理学家证明神经母细胞瘤在婴幼儿的发病十分常见，但大部分肿瘤能自发消退并从未表现出临床症状。临床上肿瘤自发消退和对治疗反应的预后的原因可以从分子水平上进行解释：hTERT 低水平表达的神经母细胞瘤端粒缺失并表现出衰老，甚至凋亡。在其他小儿肿瘤也证实了这一点，因此这一结论有普遍指导意义。

为了合理解释上述结果，研究者提出“汽车模型”的比喻来解释人类肿瘤细胞的生长：癌基因激活被形象地比喻为踩油门，而抑癌基因失活被比作刹车系统失灵，端粒酶好比是高速路上的加油站，为一路前行的汽车供给汽油。

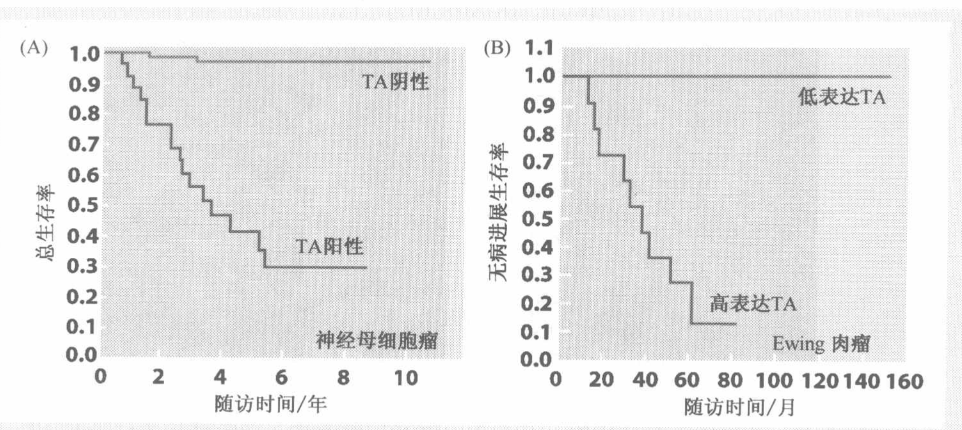


图 10.28 端粒酶活性和儿童肿瘤预后的关系 用 Kaplan-Meier 曲线描述一组患者诊断或治疗后的无病生存分析。(A) 这组病例为接受非细胞毒性化疗的小儿神经母细胞瘤患者及诊疗后的临床随访时间（横坐标）。这些病例被分成两组，肿瘤细胞端粒酶活性（TA）阳性组（红色）和端粒酶阴性组（蓝色）。这组病例没有涉及其他肿瘤分期标准。纵坐标显示患者总体生存状况，即在最初治疗后这些患者的生存率。(B) 在 Ewing 肉瘤方面也进行了类似研究。在这组病例中，患者依据端粒酶活性的高低被分为两组，红线代表端粒酶活性高的一组，蓝线代表端粒酶活性低的一组。纵坐标为无病生存率，也就是肿瘤的生长没有超出原先的分级状态。(A, from C. Poremba, C. Scheel, B. Hero et al., J. Clin. Oncol. 18: 2582-2592, 2000; B, from A. Ohali, S. Avigad, I. J. Cohen et al., J. Clin. Oncol. 21: 3836-3843, 2003.)

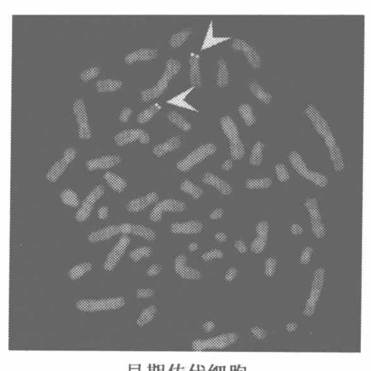
值得注意的是，端粒酶阳性的细胞已经进入衰亡后，观察不到 dn hTERT 对细胞增殖的作用，这就排除了其他的解释，即酶的突变体本身具有细胞毒性，对细胞的作用可能是非特异的损伤作用。综上所述，这些实验得出的结论是：持续的端粒酶活性对于肿瘤细胞的增殖十分重要。

10.8 某些永生化细胞在缺乏端粒酶的情况下能维持端粒的长度

前面章节提到有 85%～90%的人肿瘤细胞中端粒酶为阳性，而其余 10%～15%的肿瘤细胞检测不到此酶的活性，然而，这类肿瘤也维持最短的端粒长度，以满足无限增殖的需要。事实上，这些细胞通过一种不依赖端粒酶作用的机制来维持端粒 DNA。

这种机制首先在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中发现，随着酵母编码端粒全酶一种亚基的基因失活，使得突变的酵母细胞很快进入类似于哺乳动物细胞的衰老状态及大批细胞死亡。但是仍有极小部分的变异细胞通过利用端粒延长替代机制（alternative lengthening of telomere, ALT）的作用保护端粒使细胞存活下来，ALT 是一种不依赖端粒酶的构建并维持端粒长度的机制。少数缺乏端粒酶活性的人肿瘤细胞也可利用 ALT 机制。

对于 ALT 方式维持细胞端粒长度的分子机制仍知之甚少。一个重要线索来自于将一种可示踪的分子标记——抗新霉素基因插入处于 ALT 状态的哺乳动物细胞染色体端粒重复序列中，检测子代细胞可以发现其他端粒中也携带该分子标记的拷贝（图 10.29）。因此，处于 ALT 状态的细胞端粒序列发生了交换。



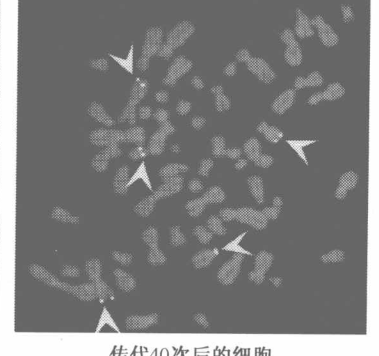


图 10.29　端粒延长替代机制　至少在一些特定细胞中，端粒延长替代（ALT）依赖于在不同染色体之间端粒序列信息的交换。图中显示，通过同源重组的方法在人 GM847 细胞的端粒靶向插入示踪标记。结果发现导入的示踪标记物已经存在于两个端粒之间（左图，箭头所示）。细胞在传 40 代后，这个序列整合到 5 条不同的染色体上（右侧，箭头）。以上结果为利用原位免疫荧光杂交（FISH）技术在分裂中期细胞中检测示踪标记序列。(From M. A. Dunham, A. A. Neumann, C. L. Fasching, and R. R. Reddel, Nat. Genet. 26:447-450, 2000.)

序列信息交换依赖于染色体间**拷贝选择**机制的类型（图 10.30），因此，在一个染色体上，复制 DNA 的聚合酶以另一个染色体作为新生链的模板，然后再返回到原来的染色体 DNA 继续进行复制。DNA 聚合酶借用另一个染色体的序列做模板，并将其整合到第一个染色体新合成的子链中。

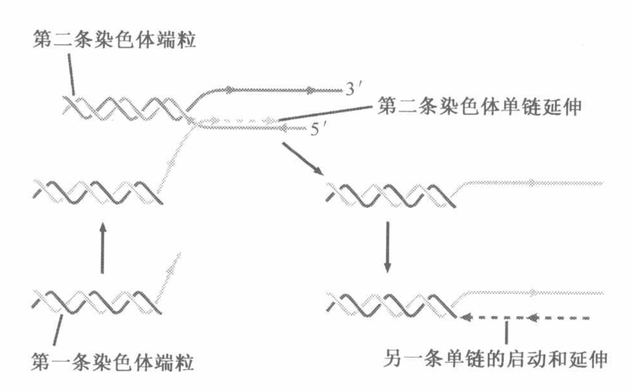


图 10.30　序列信息交换依赖于染色体间拷贝选择机制的类型　在端粒延长替代状态下，通过拷贝选择使端粒序列间发生信息交换（图 10.29），这一点可能基于染色体复制过程中 DNA 聚合酶的作用于多条染色体模板。通过一个可能的机制来解释如下：一个端粒（棕色和绿色，左下）延伸其 3′ 凸出末端（绿色），取代了在另一染色体端粒上相同极性的一条链（粉色），使该 3′凸出末端可以退火结合到后一条染色体端粒的互补链上（蓝色）。一旦这个 3′ 凸出末端连接到其他端粒上（图 10.30 上端），常规的 DNA 聚合酶能以互补链为模板（蓝色）延伸这条链（绿色虚线），随后，G 富含链从蓝色互补链（蓝色）上解离出来（右图）。新延长的 G 富含链可被常规的 DNA 聚合酶转化成双链形式（棕色虚线，右下）。这个过程可被重复数十次，导致序列信息从一个端粒传递到另一个端粒上，最终在无端粒酶存在的情况下，端粒长度延长了数千个碱基。（注意：无端粒酶时，通过外切核酸酶作用于 C 富集链，产生 3′突出末端。）箭头所示 DNA 链的方向为 5′→3′。

利用 ALT 阳性的人肿瘤细胞鉴定维持端粒结构的酶仍然不得其解。从酵母细胞的生物学行为推断，在 ALT 状态下的人类细胞中一些涉及 DNA 修复的酶可能维护了 ALT 细胞中的端粒长度。例如，在失去了参与 DNA 错配修复的一个基因的酵母细胞（12.4 节）中，ALT 的状态很容易被激活。因为其中的错配修复功能可以抑制不匹配的同源 DNA 序列发生再重组。这个发现支持染色体间的重组对于 ALT 状态起重要作用的观点。

ALT 机制的存在表明了一个事实，即所有类型的人肿瘤细胞都必须具备保持端粒长度超过一定阈值的途径以保持细胞永生化的增殖。大多数肿瘤细胞是通过解除对 *hTERT* 基因表达抑制，而少数癌前细胞通过激活 ALT 机制的途径。

ALT 状态与一些临床常见的特殊肿瘤相关，包括一半左右骨肉瘤和软组织肉瘤以及许多胶质瘤。期望有一天这一相关性可通过对 DNA 修复蛋白的质谱分析得以明确，这是一种在特殊类型肿瘤细胞内表达的蛋白，具有使得这些细胞比其他肿瘤细胞更容易激活 ALT 状态。

然而，目前就 hTERT 机制与 ALT 机制相比为何更占优势的确切原因仍不清楚。同样不明确的是为何处于 ALT 状态的人类细胞的端粒 DNA 长度多达 30kb，远比那些端粒酶阳性细胞的端粒（5～10kb）长得多。值得注意的是，dn hTER 酶（10.7 节），可使端粒酶阳性的肿瘤细胞系进入衰亡状态，而在 ALT 细胞中却没有这样的作用。这些事实支持以下观点：ALT 阳性的细胞增殖不依赖端粒酶；dn hTER 酶本身不具有细胞毒性。

hTERT 酶为致力于开发新的肿瘤治疗方法论的研究者提供了令人兴奋的靶点。然而，ALT 状态能为此项研究提供重要线索。第 16 章即将讲到，一些酶如 hTERT 的催化部位能被高特异性的靶向分药物子阻断。值得注意的是，hTERT 与人类免疫缺陷病毒（HIV）的反转录酶有着一定的同源性（10.22 节），针对后者的高效药物抑制剂已经成功地研发出来。这个成功的例子极大地增加了抗 hTERT 的药物最终也将研制成功的可能性。此外，hTERT 酶在大部分人类肿瘤中高水平表达，而在正常组织中表达不明显。这为药物的选择性提供了保障，在杀伤肿瘤的同时而不影响正常组织。

假设 hTERT 的抑制剂已被制药公司研发出来，到目前为止这个目标还未实现。已经清楚的是，至少 10%的人类肿瘤将对此类抗端粒酶药物无效，因为 ALT 阳性细胞的增殖不依赖端粒酶活性。而其余大约 90%表现出强烈的端粒酶活性的人类肿瘤，可能最初对此药物的杀伤作用敏感，然而，最终极少数突变的肿瘤细胞可能激活 ALT 通路，使这部分细胞逃避抗端粒酶药物的作用。结果导致这些携带“银弹头”抗端粒酶药物一开始具有明显的作用（能有效选择性杀死多种类型的肿瘤细胞），但最终因肿瘤细胞的变异（基因型和表型）使药物失效。

10.9 端粒在实验小鼠和人类细胞中的不同作用

我们反复将端粒酶的描述集中在人类细胞是有充分理由的。啮齿类动物，尤其是那些实验小鼠的细胞，其控制端粒酶表达的方式完全不同。虽然在胚胎后期几乎所有人类

细胞谱系的细胞 hTERT 被抑制，呈现低水平表达，但是比较实验性小鼠的对照组织细胞，发现在其一生中端粒酶都保持高水平表达。这一点对鼠类细胞端粒的细胞生物学作用有重要影响，随之，又影响人和鼠类细胞对恶性转化的相对易感性。

在鼠类组织中，端粒酶在一生中都表达，很可能导致了正常端粒相对较长：它们端粒 DNA 的双链区域长达 30～40kb——大约是人类相应端粒 DNA 的 5 倍长度。事实上，鼠的端粒如此之长，在其一生中都不存在端粒被破坏降解至临界点的危险，甚至通过实验抑制端粒酶的表达仍不能使其缩短。

鼠类端粒的长度允许细胞谱系经历更长的复制代数，超出形成肿瘤所要的时限。这说明实验小鼠不依赖端粒长度来限制正常细胞谱系复制的能力，并且端粒的破坏并不是促进啮齿类动物肿瘤发生的机制。然而，小鼠体细胞中高水平端粒酶活性和较长的端粒仍旧不足以使肿瘤细胞在此类物种中迅猛增殖（见信息栏 10.8）。

信息栏 10.8　长端粒不是肿瘤形成的充分条件　对几种转基因鼠的实验显示，小鼠的 hTERT 同源基因 *mTERT*，影响着肿瘤的形成，虽然在小鼠的细胞中，该酶支配长端粒（>30kb）的形成。例如，一种在皮肤基底角质细胞中过量表达 *mTERT* 的基因工程小鼠患皮肤癌的风险增加了 2 倍，另一种在多种组织中过量表达 *mTERT* 的小鼠乳腺癌的风险大大提高。一个明确的事实表明，在正常小鼠细胞中已经存在一定量的 *mTERT* 活性，随着肿瘤的进展其活性进一步增加。无疑，mTERT 酶促进肿瘤发生的机制不是简单的端粒延长。由于 TERT 酶很可能主要作用于端粒，其另外的功能可能涉及保护端粒末端凸出的富含 G 的单链（见信息栏 10.6）。

在某种程度上，来自实验小鼠的细胞在离体培养时，具有有限的增殖能力，而这个能力并不取决于端粒的长度。与人类细胞的生物学行为截然相反的是，鼠类细胞在培养基中进行繁衍（筛选自发永生化的细胞）时能相对容易地获得永生化。而人类细胞，需要 SV40 的大 T 癌基因和 hTERT 基因同时导入才能使细胞永生化（逃避衰亡）。

这些差异提示控制人类细胞生物学行为的核心机制之一，端粒缩短与小鼠细胞的生物学行为无关，至少在实验小鼠身上如此。关于物种间控制细胞增殖差异的生物学原理仍是一个谜。引人注目的问题是，人类细胞在其一生中平均大约经历了 10^{16} 次的有丝分裂，远比小鼠 10^{11} 次的分裂更具有患肿瘤的危险（即小鼠细胞仅为人类细胞的 0.1%，小鼠平均寿命仅约为人类的 1%）。细胞分裂上 10^5 倍的差异使人类细胞患肿瘤的风险相应增加，需要强调的是在体型大、寿命长的哺乳动物，如人类，与相对小的、寿命短的物种，如小鼠，需要演化一套额外防御肿瘤的机制。（试图从种间的差异中描绘出一个较普遍的结论是非常困难的，事实上在一些野生鼠中，其细胞对端粒和端粒酶的调节与人类细胞非常相似。）

研究者通过使小鼠生殖细胞中编码端粒酶亚单位基因 mTR RNA 失活（见信息栏 7.10）意外地发现了端粒在小鼠活细胞中的作用。如预期的那样，携带有突变 mTR 等位基因的杂合子小鼠所产生的纯合子突变后代体内所有细胞都缺乏端粒酶活性。在这类小鼠的一生中，端粒酶阴性表达小鼠的端粒可从 30kb 缩短到大约 25kb，但后者仍长于保护染色体末端端粒所需的长度。

端粒酶阴性表达小鼠与野生型小鼠的表型没有明显区别，这一点进一步证明哺乳动物中端粒酶的作用主要是维持端粒的长度，而对组织发育没有影响。

端粒酶阴性表达纯合子小鼠（$mTR^{-/-}$）在饲养至少三代以上均未出现表型的变化。但是，最终在第5代时发现端粒酶阴性的小鼠开始出现明显的表型改变。经过繁殖5代以后，端粒酶缺失小鼠的端粒长度开始缩短（图10.31）。这些第5代的$mTR^{-/-}$小鼠开始出现病态，缺少创伤修复能力，表明细胞降低了对促有丝分裂信号的反应。当繁殖到第6代时小鼠这种异常表现进一步加重。同时小鼠生育率能力明显降低。

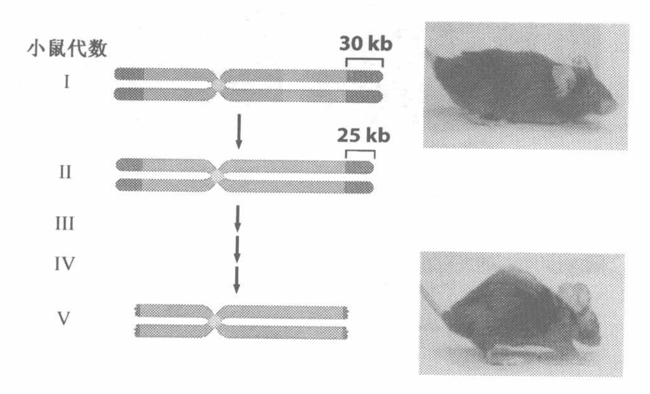


图10.31 端粒缺失小鼠（$mTR^{-/-}$） 经历若干代生殖后导致端粒的破坏：第一代$mTR^{-/-}$小鼠端粒的初始长度为30kb（红色），经过一生大约减少了5kb（左侧）。这些小鼠（右上）表型正常，第二代及第三代的小鼠也同样正常。但是到了第4或第5代后，细胞中的端粒已经受到一定程度的损伤而不能保护染色体末端结构；组织也相应失去了自我更新和损伤修复的能力，而且这些小鼠出现早衰症状，包括肌肉组织日渐消瘦，驼背（右下）。为了便于说明，图像为放大1000倍的端粒结构。（Courtesy of R. S. Maser and R. A. DePinho.）

第6代$mTR^{-/-}$小鼠出生时端粒已经很短，之后也不能维持端粒长度，尤其在有丝分裂活跃的组织中有大量的细胞死亡，组织失去功能。例如，在增殖旺盛的组织中，如胃肠的上皮细胞、造血系统和睾丸组织，开始明显的**萎缩**（细胞数减少）。这些异常现象并不与小鼠的遗传学特征平行，因为将突变导入生殖细胞中，上述表型在5或6代之后才出现。

这些结果进一步显示了人与实验性突变小鼠细胞端粒的差异。人类端粒原始长度相对较短，在经历第一代繁殖后，失去端粒酶活性并导致严重的后果（信息栏10.9）。

信息栏10.9 端粒酶功能缺陷与一种人类家族性综合征的关系 人类的一种遗传疾病——先天性角化不良（dyskeratosis congenita，DC），使原来再生能力强的组织，如皮肤、骨髓等不能再生，同时伴有染色体稳定性降低。在X连锁的病例中，一种蛋白dyskerin缺失或功能障碍。dyskerin与端粒酶相关的RNA亚基（hTR）结合，并协助hTR装配到端粒全酶复合体上（见图10.23B）。在常染色体的显性遗传的个体，由于遗传了有缺陷的hTR编码基因，增殖组织中的细胞含有染色体融合导致的双着丝粒的染色体。一些个体由于骨髓造血干细胞再生能力的丧失，导致造血系统的破坏。

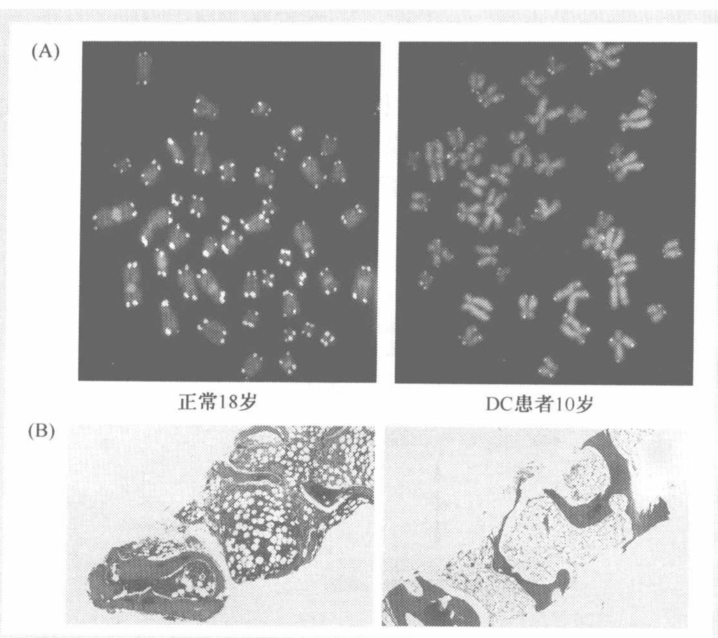


图 10.32 端粒与 DC 患者骨髓造血功能缺陷 先天性角化不良（DC）患者的许多组织萎缩的原因可追溯到有功能的端粒酶缺失或端粒的严重破坏。(A) 荧光原位杂交（FISH）用来检测分裂中期染色体的端粒，左图为一个来源于 18 岁的正常人细胞，而右图为 10 岁 DC 患者的细胞。后者细胞中的许多染色体端粒太短以致 FISH 检验不到。(B) 对 DC 患者生命威胁最大的组织萎缩往往发生在骨髓的快速增殖细胞。图中显示左侧为正常骨，钙化的骨组织中间（粉色）充满了骨髓造血干细胞（紫色）。然而，来自于亲本生殖细胞 hTR 基因缺失突变的 DC 患者骨组织中完全没有骨髓细胞（右图，可参见图 10.23B），这是由于患者的干细胞已经失去维持造血细胞增殖的能力。(A, courtesy of S. Kulkarni and M. Bessler; B, courtesy of M. Bessler.)

10.10 端粒酶阴性小鼠同时能增加和降低肿瘤的易感性

实验小鼠的自发性易感肿瘤大部分为淋巴瘤和白血病。易感性的背景是因为能通过导入特异突变能增加生殖细胞的患病风险——引起肿瘤抑制基因的失活或癌基因的激活（信息栏 7.10）。在第 5 或 6 代的端粒酶阴性小鼠中，其端粒缩短到何种程度才影响动物肿瘤的发生率？

这些问题的答案看起来简单，但是我们可以想象这些 $mTR^{-/-}$ 的小鼠的细胞退化，仅留下一些健康的细胞维持组织和机体的生存。在这些组织，通过干细胞补给不同分化程度的细胞可能难以满足需求，因为这些组织中的正常细胞仅能保障自我更新。

这一结果很明确。可以想象，在 $mTR^{-/-}$ 小鼠机体中，由于细胞衰老而没有足够的正常细胞来维持组织和机体的生命活动，参与补充组织增殖分化的干细胞不能满足这一功能，导致正常细胞过少以致不能维持机体的更新。

初始的肿瘤细胞具有同样的处境，癌前病变的细胞需要获得大于周边正常细胞增殖

分裂的能力和数量（图 10.33A)。结果导致已启动癌变的细胞克隆在发展成肿瘤之前很可能就已经凋亡。

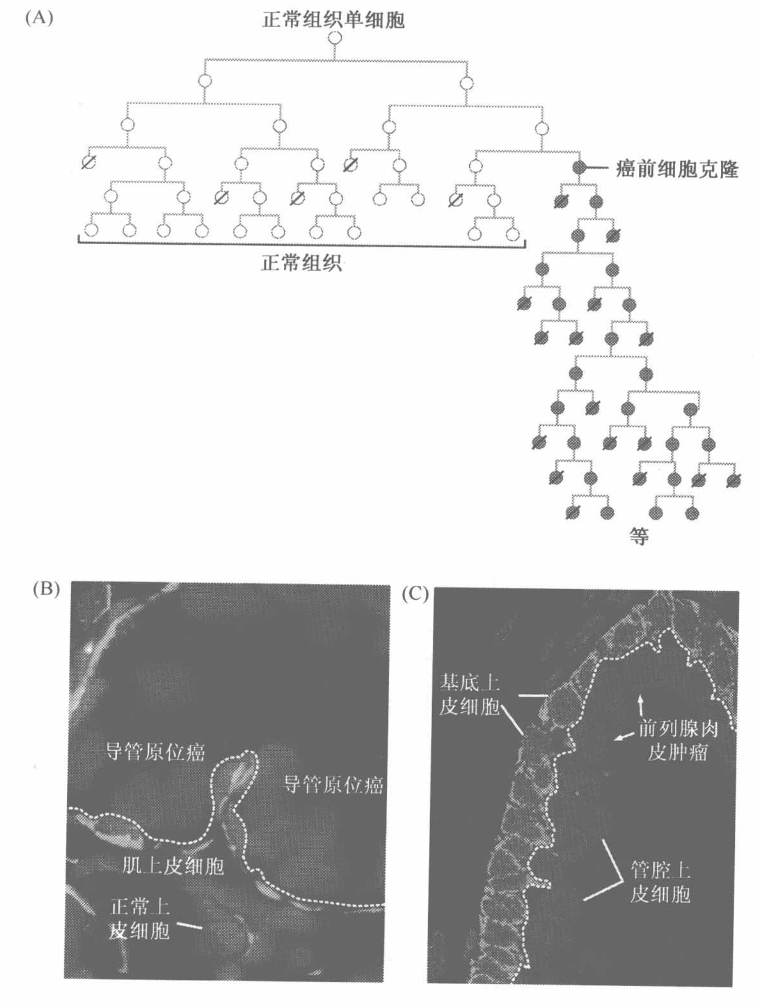


图 10.33　mTR$^{-/-}$小鼠和人的正常和肿瘤细胞谱系　(A) 显示了在一小片组织中正常细胞的谱系（空心圈）在胚胎中的初始细胞作为这一组织生长发育的祖细胞，如所有的上皮细胞。在某一时刻，一个正常上皮细胞发生改变从而演变成癌前病变细胞的祖细胞（实心红色圆)。这个细胞克隆必须经过许多代复制，才能最终形成肿瘤。斜线表示几乎在每一代都有大量的细胞凋亡或坏死。(B) 细胞成瘤过程必须经过许多代细胞繁殖，在这个过程中造成大量的端粒破坏。图中通过 FISH 显示端粒（粉红点)。在正常的人乳腺导管的管腔上皮细胞（下部）和肌上皮中均有端粒。但是，在乳腺的导管原位癌（DClS)，构成肿瘤细胞群体的导管上皮细胞（上部虚线）中，失去了所有能检测到的端粒 DNA。而在邻近正常肌上皮细胞（下部虚线，α-平滑肌肌动蛋白染色，绿色)，仍有深染的端粒（在所有病理片中，胞核染成蓝色)。(C) 在前列腺内皮肿瘤（PIN)——前列腺癌的早期病变中，也有类似的动态变化，许多管腔上皮细胞（下部右侧的箭头）已经没有端粒 DNA 的染色，而角蛋白阳性（左上部的点线）的基底上皮细胞（左上部）仍然显示强阳性的端粒 DNA 信号。(B and C，courtesy of A. K. Meeker；see also A. K. Meeker，J. L. Hicks，E. A. Platz et al.，Cancer Res. 62:6405-6409,2002.)

为了验证这一假设，利用小鼠生殖细胞，通过使抑癌基因失活，编码 16^{INK4A} 和 $p19^{ARF}$ 的抑癌蛋白（8.4 节和 9.7 节）同时被抑制，产生易患癌的小鼠（信息栏 7.10）。如预料的那样，这些小鼠中具有较高的肿瘤易感性，相对早的易发生淋巴瘤和纤维肉瘤。在致癌物的暴露下，这种易感性更加明显。在一系列的实验中，将小鼠用致癌物二甲基苯并蒽（dimethylbenzathracene，DMBA）处理，接着重复接受紫外线（UV-B）的照射，20 周后，在 $16^{INK4A}/p19^{ARF}$ 阴性表达的突变型小鼠中，肿瘤发生率为 90%，而同样处理的对照组野生型小鼠在同一时间没有肿瘤发生。

进一步实验表明，将 $16^{INK4A}/p19^{ARF}$ 失活的生殖细胞导入缺少 mTR 的小鼠，后者编码小鼠端粒酶全酶的 RNA 亚基（图 10.31）。在对照组，端粒酶阳性、$16^{INK4A}/p19^{ARF}$ 阴性的小鼠有 64% 发生肿瘤，而在第 4、5 代，$mTR^{-/-}$ $16^{INK4A}/p19^{ARF}$ 阴性的小鼠仅有 31% 发生肿瘤。通过观察小鼠 16 周的生存率，88% 端粒酶阳性小鼠因患肿瘤死亡，而在端粒酶阴性的第 5 代小鼠仅有 46% 死亡，差异具有显著性。

端粒酶阴性小鼠患癌率低表明 $mTR^{-/-}$ 小鼠的正常组织在肿瘤发生前已经耗尽所有复制能力。这些小鼠体内一旦启动肿瘤，初始的肿瘤细胞群在形成肉眼可见的肿块前必须经过许多代的增殖（图 10.33A）。然而在肿瘤发展的相对早期，这些具有增殖潜力大肿瘤细胞因端粒的破坏而启动衰老，肿瘤发生消退。实际上，在人组织中，癌前病变的细胞在成瘤的过程中其端粒长度明显缩短，这一改变可能是因为进入细胞周期的细胞群体多于周围正常细胞（图 10.33B 和图 10.33C）。

敲除生殖细胞 *p53* 基因两个拷贝的小鼠表现与 $16^{INK4A}/p19^{ARF}$ 失活小鼠完全不同的结果。通常，在 $p53^{-/-}$ 小鼠的 *mTR* 基因引入突变，使小鼠生殖细胞 p53 失活导致患癌风险和死亡率的增加，这一点与人类 Li-Fraumeni 综合征的状况类似（9.12 节）。

分析第 5、6 代的 *mTR*/ 伴有 $p53^{-/-}$ 的小鼠细胞基因组，发现其肿瘤形成率明显高于单纯 $p53^{-/-}$ 小鼠。而且肿瘤的类型从 $p53^{-/-}$ 小鼠常见的淋巴瘤和血管肉瘤扩大到人类常见的肿瘤，这一发病趋势在第 7、8 代端粒阴性小鼠更为明显（图 10.34）。

如何解释这一有趣的结果？可以设想由于第 5、6 代小鼠的细胞已经耗尽端粒，细胞染色体开始进入 BFB（断裂-融合-桥）循环，之后出现衰亡。我们已经明确 BFB 循环造成的双链 DNA 断裂诱导的凋亡依赖于 p53。因此，携带正常 *p53* 基因并进入 BFB 循环的细胞可能迅速从组织中消失。

这些结果表明，细胞核型的异常导致基因的变异（包括许多易位、缺失和基因扩增）。伴随细胞表型的变化，部分很可能参与促进肿瘤的增殖。可以肯定的是，遗传不稳定性将会促进肿瘤形成的风险。这一点可以解释 p53 缺失是端粒受损和肿瘤发生的基础。$mTR^{-/-}$ 小鼠，有着与人的相似之处：在角化发育不全综合征的患者（信息栏 10.9），通过骨髓移植成功地重建造血系统易导致肿瘤的复发。一些容易恶变的病变，如骨髓异常增生、急性髓性白血病或胃肠道肿瘤等，这些病变组织具有肿瘤增殖的特性，包括端粒酶活性丧失，端粒结构的破坏，导致 BFB 周期的重复。

第 5 或第 6 代的 $p53^{-/-}$，$mTR^{-/-}$ 阴性小鼠具有特殊的生物学行为。其中 *p53* 基因缺失的小鼠的致瘤性显著增加。此外，肿瘤的多发类型为淋巴瘤和血管肉瘤，这在 $p53^{-/-}$ 鼠中十分常见。这些肿瘤类型在人类中也很常见。这种趋势将会在第 7、8 代的端粒酶阴性的小鼠中更为明显（图 10.34）。

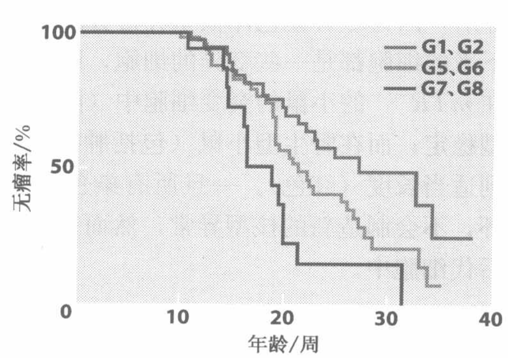


图 10.34 肿瘤易感 $mTR^{-/-}$、$p53^{-/-}$ 小鼠的肿瘤发生率 通过 Kaplan-Meier 曲线分析，随着繁殖传代，生殖细胞同时缺失 p53-和 mTR-编码基因的小鼠的肿瘤发生率明显增加。在第 1、2 代（G1、G2，红色）小鼠，到 24 周龄，大约 50%的小鼠已经检测到肿瘤，而在第 5、6 代（G5、G6，蓝色），肿瘤发生率快速增长，到第 7、8 代（G7、G8，棕色），大约 50%的小鼠在 17 周龄已患肿瘤。（From L. Chin, S. E. Artandi, Q. Shen et al., Cell, 97: 527—538, 1999.）

在 $p53^{-/-}$，$mTR^{-/-}$ 小鼠经过 BFB 循环周期后，仍能很好地生存，这是因为单个细胞的基因组染色体断裂导致与凋亡相关的成员 p53 等丢失可能使细胞存活下来。尽管染色体核型紊乱影响细胞的基因组稳定性，但由于持续的 BFB 循环，这些细胞仍具有代偿能力。

当第 5、6 代 $mTR^{-/-}/p53^{-/-}$ 小鼠经过 BFB 循环时，为了生存需要修复染色体 DNA 断裂损伤。然而，许多细胞由于缺乏 p53 而丧失关键的凋亡反应机制得以存活下来。尽管染色体核型紊乱，这些细胞仍然部分保留细胞生长和分裂能力，而且这些细胞的染色体能持续数周 BFB 循环。

由于 p53 缺失而不能诱导细胞凋亡，使这一恶性循环不断在细胞中反复进行。结果导致，在 BFB 过程中出现大量染色体易位而导致细胞的基因组不稳定。更重要的是，有证据表明双链 DNA（dsDNA）破坏导致断裂区附近染色体的扩增或缺失。

尽管还没有证明 BFB 循环对 p53 阴性的细胞会产生致命的影响，但是这种恶性循环一定会影响细胞的增殖能力。这意味着单个细胞要面临很大的选择压力来逃脱 BFB 的循环并恢复核型的稳定；一旦完成这一过程细胞便能快速增殖。由于在生殖细胞中 *mTR* 基因已经被敲除，因此这些细胞中的端粒酶不再被激活。基于这点，细胞一旦通过旁路激活 ALT 端粒维护系统，细胞将能够稳定由于祖细胞失去端粒后造成的异常核型，使细胞重新保持增殖状态。

显然，核型紊乱会促使细胞产生新的基因结合（包括易位、缺失、扩增），在这些新的基因中，有一些可能有助于肿瘤形成，这也相应地解释了在 p53 阴性的细胞中端粒破坏实际上能推动肿瘤发展。

$mTR^{-/-}$ 小鼠模型可以找到一些人类的对照，在先天性角化不良综合征患者（DC）（见信息栏 10.9）中，一旦进行骨髓移植使崩溃的造血系统成功重建，常常会发生肿瘤，一些发展成血液恶性肿瘤（诸如脊髓发育不良和急性髓性白血病）或胃肠道癌。肿瘤发生在持续快速增殖的组织中，这些组织正是端粒酶活性缺失、端粒迅速破坏的部位，导致 BFB 的恶性循环。

这一有趣的结果如何解释呢？可以认为小鼠经过第 5 到第 6 代后，端粒耗竭，细胞开始进入断裂-融合-桥（BFB）循环（见图 10.14 的衰老状态）。我们已知细胞进入 BFB 周期，双链 DNA 断裂，激活 p53 依赖的信号途径诱导凋亡发生（9.6 节）。因此，携带 *p53* 功能基因并进入 BFB 周期的细胞极易发生凋亡。

通过 BFB 循环的细胞可能被 p53 诱导的凋亡清除，但是 p53 功能缺失的细胞得以

存活，因为尽管染色体核型异常会减弱细胞增殖能力，但不会引发细胞凋亡。这样存活下来的细胞都是一些变异的细胞，能再生端粒，进而又能稳定其核型，随后快速增殖。在 $mTR^{-/-}$ 的小鼠的突变细胞中（图 10.34），通过激活 ALT 端粒维护系统能再次使核型稳定；而在野生型小鼠（包括肿瘤患者），解除 hTERT 表达的抑制，可使端粒重建到适当长度（红色）。一旦所有染色体末端的端粒得以重建，后代细胞就逃脱 BFB 循环，不会制造新的核型异常，然而此前由于 BFB 循环造成的核型异常将永久地保持在后代细胞中。

10.11 端粒酶阴性小鼠的肿瘤发病机制可能同样适用于人类肿瘤

大量转基因小鼠模型的研究结果为我们提供了一个极为有趣的肿瘤发病机制模型（图 10.35），可以解释为什么大多数的人类肿瘤中存在非整倍体染色体。推论一下，在漫长的肿瘤发生发展过程的初期，癌前病变的细胞群体中的部分细胞丢失 *p53* 基因拷贝。这种选择压力导致基因缺失的原因在于癌前病变细胞经历缺氧，并会导致 p53 诱导细胞凋亡。选择的余地是 *p53* 基因拷贝已在初始的肿瘤细胞中丢失，从而降低了抑癌基因诱导细胞凋亡的可能性（见 9.6 节）。

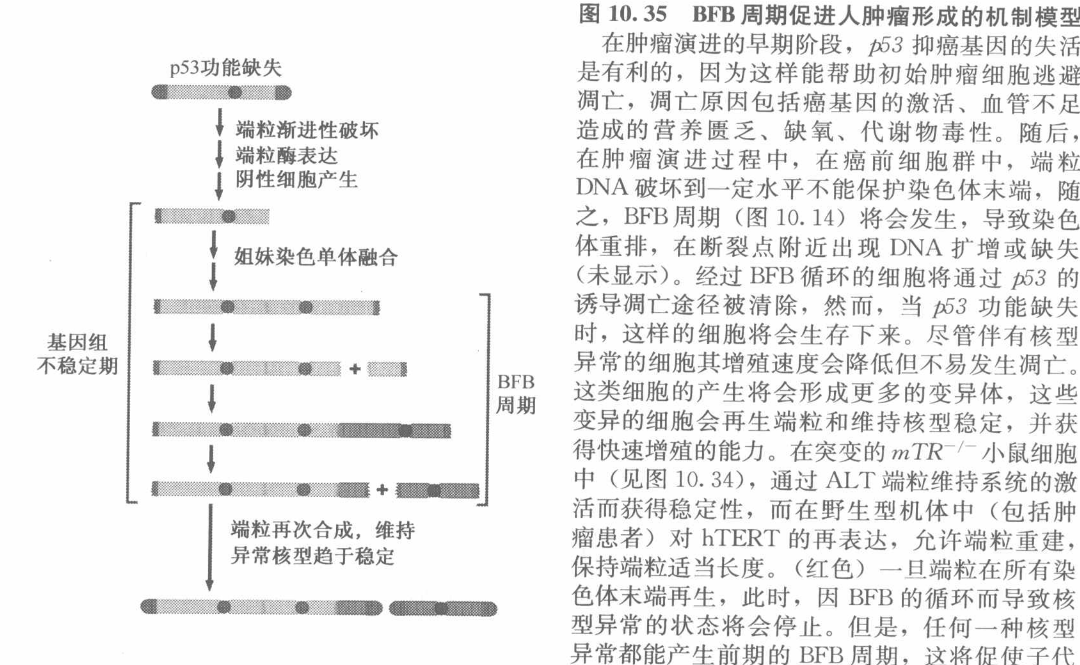


图 10.35 BFB 周期促进人肿瘤形成的机制模型 在肿瘤演进的早期阶段，*p53* 抑癌基因的失活是有利的，因为这样能帮助初始肿瘤细胞逃避凋亡，凋亡原因包括癌基因的激活、血管不足造成的营养匮乏、缺氧、代谢物毒性。随后，在肿瘤演进过程中，在癌前细胞群中，端粒 DNA 破坏到一定水平不能保护染色体末端，随之，BFB 周期（图 10.14）将会发生，导致染色体重排，在断裂点附近出现 DNA 扩增或缺失（未显示）。经过 BFB 循环的细胞将通过 *p53* 的诱导凋亡途径被清除，然而，当 *p53* 功能缺失时，这样的细胞将会生存下来。尽管伴有核型异常的细胞其增殖速度会降低但不易发生凋亡。这类细胞的产生将会形成更多的变异体，这些变异的细胞会再生端粒和维持核型稳定，并获得快速增殖的能力。在突变的 $mTR^{-/-}$ 小鼠细胞中（见图 10.34），通过 ALT 端粒维持系统的激活而获得稳定性，而在野生型机体中（包括肿瘤患者）对 hTERT 的再表达，允许端粒重建，保持端粒适当长度。（红色）一旦端粒在所有染色体末端再生，此时，因 BFB 的循环而导致核型异常的状态将会停止。但是，任何一种核型异常都能产生前期的 BFB 周期，这将促使子代细胞群体保持活跃的增殖能力。

有时，在 p53 功能缺失后，随着肿瘤不断演进，由于端粒酶活性明显降低，癌前病变细胞的端粒开始加速缩短，并且最终被破坏。随之重复的 BFB 循环将导致非整倍体形成。但是，由于这些细胞同样丧失 p53 的功能，仍能继续保持一定的增殖能力。

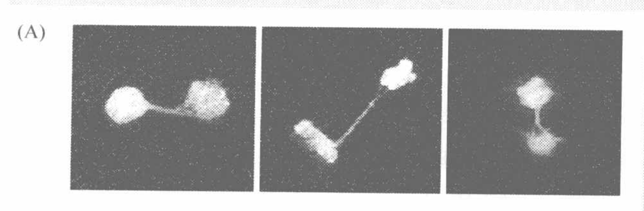
在已进入 BFB 循环的细胞群中，总有某一个细胞将获得 *hTERT* 基因再表达的能力，这样，细胞能够使核型保持稳定从而阻止细胞进入 BFB 循环。可以想象这些细胞

一旦有端粒酶活性，将会对染色体DNA的分子末端进行修复，进而使细胞再次迅速增殖。当然，这些再次激活的端粒酶不能使大量的非整倍体复原，这些非整倍体的累积始于端粒破坏，终于hTERT表达的一段时间内（通过启动ALT机制保护基因组再次进入BFB循环而不依靠端粒酶活性）。

人胰腺癌演化过程的研究为这一模型提供了依据。在多阶段胰腺组织癌变过程的早期，在低级别腺瘤的有丝分裂细胞中，少量的后期桥是BFB循环的标志。但是，进一步在重度不典型增生腺瘤细胞中出现大量的桥。之后在原位癌中，后期桥的水平再次降低。这种生物学行为强有力地支持这一模型。如上所述，BFB循环及与之相关的染色体不稳定性通常发生在肿瘤多阶段进程中的特定阶段。

另外，依据对人食管癌、结肠癌和乳腺癌的研究表明，端粒相对短的肿瘤预后不良，而长端粒的肿瘤预后相对较好，包括较长的生存期。这里，我们再一次强调：拥有长度不适宜端粒的肿瘤细胞具有相对频繁的BFB循环，或许是因为它们表达hTERT的水平不足以保护和维持端粒DNA长度。BFB循环随后在肿瘤形成过程中，造成一种持续性的染色体不稳定，产生新的异常基因型，其中的一些变异对诸如恶性增殖和侵袭性生长的表型有利。某些与肿瘤高风险的慢性炎症可能与端粒破坏和BFB循环有关（见信息栏10.10）。

信息栏10.10　慢性炎症器官中的端粒异常可能导致肿瘤的发生　我们将在第11章中论述慢性感染或炎症导致人类组织细胞持续性损伤从而诱发细胞癌变和肿瘤大的发生。这种持续的细胞耗损，往往经历十几年至几十年之久，这些组织往往因患溃疡性结肠炎、Barrett食管炎及乙肝或丙肝病毒感染造成。在这些受影响的组织中，由于分化细胞的损失，迫使这些干细胞比在正常组织中的干细胞要进行更活跃的细胞分裂。这种超负荷的复制分裂将会超过干细胞的再生能力，最终导致端粒破坏，激发BFB周期（breakage-fusion-bridge cycle），在子代细胞中产生有利于癌变细胞增殖的染色体核型。



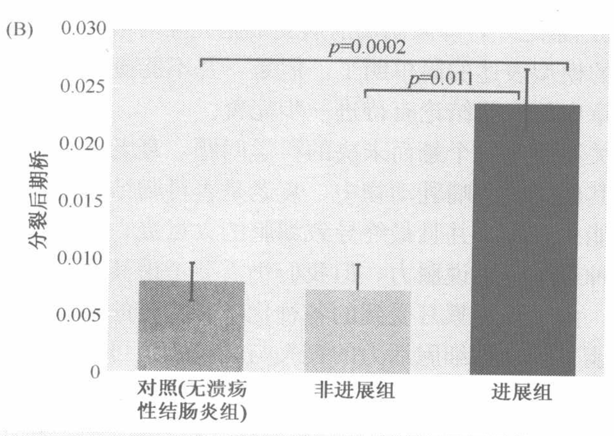


图10.36　溃疡性结肠炎和分裂后期桥　溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）指结肠上皮受到慢性刺激和炎症反应，引起结肠上皮细胞持续长达数十年之久的病变，并具有患结肠癌的风险。(A) UC患者被分为“进展”组和“非进展”组，前者的结肠已有一个甚至多个肿瘤，后者没有肠道肿瘤。在这些“进展”组患者的结肠上皮细胞中，经常发现有丝分裂后期桥，是BFB周期的标志（见图10.14和图10.15）。并且，这些细胞的端粒普遍偏短并有大量核异常型（未显示）。(B) 正常个体的结肠组织和“非进展”UC患者组织细胞中后期桥相对较少，而在“进展”的UC患者炎症上皮中发现大量后期桥，显示了后期桥与肿瘤发生的相关性。p值显示差异具有显著性。(From J. N. O'Sullivan, M. P. Bronner, T. A. Brentnall et al., Nat. Genet. 32: 280-284, 2002.)

这样的一个机制可能较好地解释，为何患有各种炎症和慢性感染性疾病的个体中的肿瘤发病率高。事实上，在溃疡性结肠炎患者的肠上皮细胞内，可发现后期桥，是 BFB 循环及端粒的破坏的标志。正如我们预料，端粒破坏将导致结肠癌的发生（图 10.36）。在 Barrett 食管炎细胞（图 2.13）中同样有后期桥，由于胃酸返流加速食管上皮的更新，很大程度上可导致食管癌发生。

这一模型对广泛存在于人类肿瘤细胞中的非整倍体核型现象给予明确的解释。虽然没有直接的实验证据，但是普遍的观点认为，非整倍体核型通过增加促增殖的原癌基因的表达，或清除控制细胞增殖的抑癌基因而使细胞获得生长优势。因此，这一 BFB 循环可能成为加速肿瘤进展的重要因素，即通过增加基因组的不稳定性，使演变中的癌前病变细胞产生大量新的可能具有优势的异常基因型。

这一推测没有详细表述前面提到的实验现象，在 $mTR^{-/-}$ $p53^{-/-}$ 小鼠中反复的 BFB 恶性循环可影响肿瘤的类型，诱导产生人类常见的肿瘤而不是小鼠中常见的血液病和间质瘤。对端粒的生物学功能研究可能有助于解释为什么肿瘤会发生在某些组织，而其他的组织则不会或很少发生？

这一模型提供了一个很有意义的机制，表明多种类型人类肿瘤细胞具有高频率的非整倍体核型。尽管没直接的证据，但普遍认为这些细胞中，染色体易位、原癌基因活化和抑制癌基因失活等途径产生了非整倍体并使细胞获得增殖优势。因此，BFB 循环可能是加速肿瘤演进的促进因素，通过增加基因组的变异，导致癌前病变细胞获得有利于肿瘤发生发展的基因型。

上述论点仍然不能解释前面提到的问题：在 $mTR^{-/-}$ $p53^{-/-}$ 小鼠中，重复的 BFB 循环如何影响这些小鼠所患肿瘤的类型并使这类细胞进一步发展为肿瘤。这一点在人类中也很常见，但不像小鼠那样易患血液和间叶组织细胞的肿瘤。关于端粒与患病组织特异性的关系有待进一步研究。

10.12 总结与展望

Barbara McClintock 首次对玉米染色体末端的端粒进行描述时，并没有预料到这一发现能与肿瘤发病机制的分子模型联系到一起。端粒作为细胞增殖能力的一个主要决定因素，限制细胞停止增殖并进入衰老状态前所需的增殖分裂周期。人类正常细胞的这种限制增殖潜能的功能是抑制肿瘤发展的主要因素之一，即限制癌前病变细胞克隆的增殖。

这一细胞永生化和肿瘤发病机理的模型表述的简单明了。但是，并不能掩盖我们对端粒结构和功能知之甚少的事实，本章中的一些结论有待进一步完善。

本章所表述的学术观点与衰老的关系仍是一个悬而未决的科学问题，衰老是生物医学领域的另一个重要问题。在人类和其他长寿的哺乳动物中，衰老是否可归结为端粒持续的缩短，使一些组织中细胞的增殖能力丧失，并且最终导致细胞的大量衰亡而不能维持组织结构和功能的完整性？尽管这种观念很有说服力，但我们仍需要考虑其他可能的机制。例如，在数十年的生命过程中，由于长年累月受到的各种化学和遗传的损伤，衰老组织中的细胞逐渐丧失生长和修复能力，这种细胞活力的丧失与端粒缩短可能没有直接关系。与这些问题相关的另一个问题是端粒缩短是否可增加老年人的肿瘤发病率（信息栏 10.11）。

信息栏 10.11　端粒缩短能否增加老年群体肿瘤的发生率？ 随着人体进入老龄化，多种肿瘤的发生率增加，其具体机制很复杂，可能包括基因组变异的累积，衰老导致的免疫力下降。事实上，肿瘤的演进是一个漫长的、多阶段的过程，通常需要几十年的时间。端粒逐渐缩短可能也是一个原因。图 10.37 的数据显示，可以得出以下三点结论：①在某些或大多数的人类组织中，随着年龄增加，端粒逐渐缩短；②不同组织的端粒缩短速度不同，可能与研究所用的细胞谱系有丝分裂能力的差异有关；③个体间在生命早期端粒 DNA 的长度和（或）端粒缩短的频率有较大差异（此外，一个众所周知的问题有待明确：在一个细胞中，不同染色体末端的端粒 DNA 也不尽相同，而且，每一染色体所具有的长度也不一定相同）。

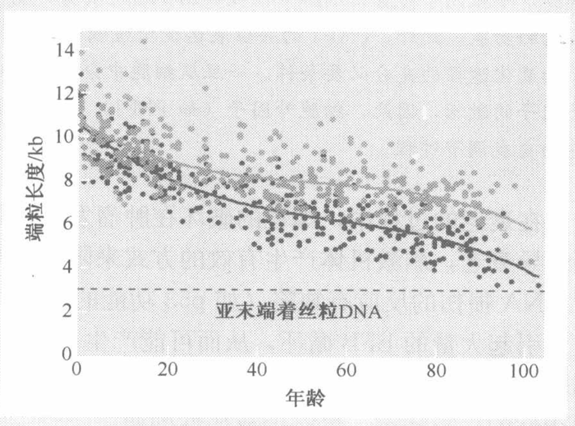


图 10.37　端粒、衰老与肿瘤　通过对 400 份不同血样中的淋巴细胞和粒细胞端粒 DNA 长度分析结果表明，在两种细胞中，随着年龄的增加端粒长度均持续缩短。测量的误差为±0.5kb。水平虚线表示域值水平，低于阈值水平的端粒 DNA 不能对染色体末端起到保护作用。(Courtesy of G. M. Baerlocher and P. Lansdorp.)

端粒末端破坏到临界值以下就不能对染色体 DNA 末端起保护作用。在一些细胞中，这一逐渐缩短的端粒可能限制了细胞谱系的增殖能力，从而起到抗肿瘤作用，然而，这种端粒也可能引起染色体末端之间的融合并诱导 BFB 循环，导致染色体核型不稳定和肿瘤发生。这样看来，端粒破坏可能是老龄群体中肿瘤发病率增加的重要因素，这一观点还需要进一步的实验证据。

端粒破坏并缩短到一定长度时，失去了保护染色体末端的能力。在有些细胞中，端粒缩短可能危及细胞的增殖能力，因此具有抗肿瘤作用。与此同时，显著缩短的端粒可能刺激染色质末端与末端的融合，后者又可能激发细胞进入 BFB 周期——进而导致染色体核型的不稳定和肿瘤的发生。端粒破坏，可能是导致老年群体中肿瘤发生率高的重要因素之一。这个假说还需要进一步实验证据。

通过体外培养细胞的观察和对细胞增殖调控机制的不断探索显示：大量培养的正常细胞迟早会停止增殖，进入自我维持的状态，丧失增殖能力，此时称为老化。而有些细胞可能避开老化期，并获得一定的增殖能力。但此时端粒的破坏可诱发大量染色体异常。“衰老”的研究已成为肿瘤生物学的热点问题，因为端粒破坏、染色体紊乱，结果导致大量的、不同类型的细胞逃脱老化。反之，通过干预培养细胞老化则成为某些肿瘤的促癌因素。以上观察到的现象仍旧不明确：是否重复的老化过程影响活体组织的细胞，而且，控制细胞老化的基本生化机制仍不清楚（信息栏 10.12），这些问题表明我们对细胞生理状态的理解还需要经过大量的实验研究。

信息栏 10.12　细胞老化能否蔓延传播？　本章节描述了细胞自发的老化过程，细胞内信号激发，使细胞进入老化状态并可维持。但是，筛查维持细胞衰老的基因过程中，发现一个编码血浆酶原激活抑制剂（plasminogen activator inhibitor-1，PAI-1）的基因。

血浆酶原激活剂（plasminogen activator）是一个细胞外蛋白，能将血浆酶原转化成纤溶酶；后者同样是一个蛋白酶，能消化多种细胞外底物，未激活的生长因子前体也是纤溶酶的底物，在纤溶酶的作用下形成活性的有丝分裂原和存活因子。PAI-1 能阻遏纤溶酶的激活，因此也抑制了细胞外生长因子的激活。

PAI-1 基因是 p53 转录激活的一个靶点（表 9.2）。p53 诱导的 *PAI-1* 转录后，PM-1 从细胞中释放，增殖因子的蛋白水解活性被抑制。通过实验抑制 p53 介导的 *PAI-1* 活性，p53 就失去它诱导衰老的功能。此外，PAI-1 的异位表达使增殖强劲的细胞进入衰老。因此，PAI-1 的表达是 p53 介导的衰化途径的充分必要条件。一旦从细胞中分泌出来进入细胞外空间，PAI-1 能阻滞邻近细胞生长因子的激活，因此，细胞外因子（如 PM-1）可以调控细胞衰老，从这个角度而言，衰老不是细胞的自我调节过程。

在衰老的过程中，端粒的破坏在肿瘤发生发展中就像一把双刃剑。一面是端粒破坏和诱导衰老，刺激机体产生有效的方式来限制肿瘤细胞克隆性生长；另一面，如果细胞对 DNA 损伤的反应有缺陷（如 p53 功能的丧失），这些细胞能够携带破坏的端粒生存，这又引起大量的 BFB 循环，从而可能产生有利于恶性增殖的基因型（图 10.38）。随后端粒酶活性的获得能使这类遗传改变的细胞充分利用这些异常的基因型来进入一种高度侵袭性的生长状态，最终形成恶性肿瘤。

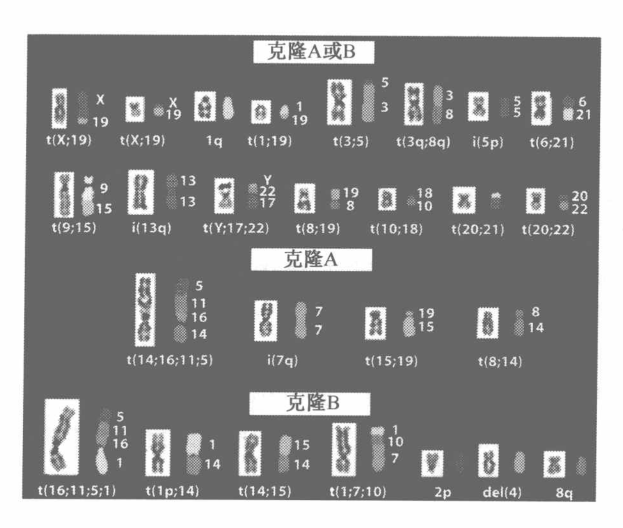


图 10.38　染色体核型异常，通过使用 SKY 技术，将每一个染色体标以不同颜色，来揭示肿瘤细胞的染色体核型。在对人类膀胱癌细胞系的两个亚克隆（A 和 B）观察中，发现大量染色体易位。许多染色体携带有来自两个正常染色体的片段，而一些染色体的片段来源于四个不同的正常染色体，这些事实充分证明易位的发生。易位用“t”后面接数字，标记染色体片段的亲本来源。“i”代表等臂染色体，也就是早染色体中，同样的臂复制形成等长的。“p”和“q”分别代表染色体的短臂和长臂。“del”代表染色体片段的丢失。克隆 A 与 B 表示了两个亚克隆中相同的异常染色体，而克隆 A 和克隆 B 分别表示只在亚克隆中出现的染色体核型。两个亚克隆间染色体的核型差异源于在培养过程中持续的染色体不稳定。培养的肿瘤细胞中发现相当多的非整倍体。（From H. M. Padilla-Nash，W. G. Nash，G. M. Padilla et al.，Genes Chromosomes Cancer 25：53-59，1999.）

关于端粒酶本身的作用也有较大争议。hTERT 的表达能引起一些关键酶活性的启动，因为这些细胞中包含了除 hTERT 催化亚基以外的端粒酶全酶的成分。一旦 hTERT 表达，就能催化端粒酶的活性，导致永生化状态的发生。这种增殖能力的提高引起研究老年医学专家的兴趣，如何防止衰老并恢复老年人组织细胞的活力是一个难

题。如上所述，有人认为端粒破坏是衰老的原因，提出利用 hTERT 作为改善衰老组织增殖能力的方案。但是，由于端粒酶具有的双重作用，若将端粒酶导入衰老的组织，可能引起原来散布在组织中的某个癌前病变细胞不可逆转地永生化，形成可见的肿瘤，否则，这些组织可能永远不会发生肿瘤。

在下一章中，将通过直接而有力的实验证据，详细阐述端粒和端粒酶在肿瘤发病机理方面的作用：在通过基因导入将正常细胞转化成致瘤细胞的实验中，*hTERT* 基因是一个不可或缺的成分。没有 *hTERT* 人类细胞不能发生转化（细胞转化实验证明了这一点，通过外源基因导入，如 *myc*，可以诱导内源性 *hTERT* 基因的表达，从而完成细胞转化）。

端粒酶的作用好比肿瘤细胞增殖的加油站，这提示了一种新的抗癌治疗策略。端粒酶抑制剂的使用可能会有效地杀死携带有相对较长端粒的肿瘤细胞，因为在大多数肿瘤细胞中，端粒酶表达为阳性。如果成功，这种药物应当对正常细胞的毒副作用小，因为机体中正常细胞的端粒酶水平较低，仅在 S 期瞬间表达。

尽管这一观点很受鼓舞，但是由于一些现实结果不尽理想而不能推广，一些制药公司对新的 hTERT 抑制剂进行研发和临床试验，均以失败而告终，失败的原因不明确；而且和体内是否存在某些端粒酶高表达的正常细胞，现在还不确定这些端粒酶抑制剂是否对正常细胞的增殖和生存有着重要影响。因而，抗端粒酶药物的毒副作用还难以预测。

尽管有这些困难，hTERT 酶仍旧是一个候选的靶向药物。因为它的活性对大部分的人类肿瘤细胞来说是必需的，抗端粒酶药很可能在治疗各种类型的肿瘤中发挥重要作用。事实上，这种药物的研制起始于对 hTERT 酶在玉米遗传学和纤毛虫的生命周期中的作用研究，这终将在攻克肿瘤疾病研究方面发挥重要作用。到目前为止，作为治疗药物的研究仍旧是一个梦想。

重要概念

1. 两种因素限制了培养细胞的无限增殖能力——衰老和凋亡。
2. 衰老指细胞长期处于不再增殖的自我存活状态；凋亡指细胞的程序性死亡。
3. 体外培养的生理性应激引起细胞衰老，但衰老在体内限制细胞增殖的作用有待明确。
4. 端粒的破坏诱导凋亡，其结果是大范围的染色体末端与末端融合、核型异常和细胞死亡。
5. 大多数癌前病变的细胞通过激活 hTERT 的表达逃离危机，端粒酶能特异地通过增加六核苷酸拷贝来延伸端粒 DNA 的长度。
6. 一些肿瘤细胞通过 ALT 机制使端粒 DNA 再生以抵抗凋亡。
7. 细胞通过端粒酶作用或 ALT 机制来稳定端粒，获得无限增殖能力——永生化状态。
8. 细胞永生化是人类肿瘤的发生与发展的先决条件。
9. 伴随细胞凋亡的染色体末端融合将导致反复的 BFB 循环，这是多种人类实体肿瘤细胞中非整倍体核型产生的原因。

思考问题

1. BFB 周期对于癌前病变细胞群带来哪些优点？
2. 为什么细胞永生化对肿瘤的发展如此重要？
3. 哪种类型的端粒和端粒酶表明细胞已进入衰老生长状态？
4. 若假设有一种抗癌药是端粒酶的特异性抑制剂，那么它会带来什么新的问题和副作用？
5. T 环的分子构型如何保护端粒 DNA？
6. 端粒酶相关的 hTR RNA 分子是如何通过 hTERT 酶促进并维护端粒 DNA 的？

参考读物

Aisner DL, Wright WE & Shay JW (2002) Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 80–85.

Artandi SE & DePinho RA (2000) Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nat. Med.* 6, 852–855.

Bérubé NG, Smith JR & Pereira-Smith OM (1998) Insights from model systems: the genetics of cellular senescence. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1015–1019.

Blasco MA (2002) Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2, 627–633.

Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.

Blasco MA & Hahn WC (2003) Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol.* 13, 389–394.

Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522.

Cong Y-S, Wright WE & Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 407–425.

Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG et al. (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* 125, 827–848.

de Lange T. (2004) T-loops and the origins of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 323–329.

DePinho RA (2000) The age of cancer. *Nature* 408, 248–254.

Hanahan D (2000) Cancer: benefits of bad telomeres. *Nature* 406, 573–574.

Harrington L (2004) Those dam-aged telomeres! *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 22–28.

Hayflick L & Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.

Lundblad V (2001) Genome instability: McClintock revisited. *Curr. Biol.* 11, R957–R960.

Mathon NF & Lloyd A (2001) Cell senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 203–213.

Neumann AA & Reddel RR (2002) Telomere maintenance and cancer—look, no telomerase. *Nat. Rev. Cancer* 2, 879–884.

Shay JW & Wright WE (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.

Shay JW, Zou Y, Hiyama E & Wright WE (2001) Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10, 677–685.

Stewart SA & Weinberg RA (2000) Telomerase and human tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* 10, 399–406.

（吕有勇　潘元明　王根宇）

第 11 章 肿瘤发生发展的多阶段模型

我们从那些经过长期生存竞争后而存活下来的优势个体和种族身上可以看到，优胜劣汰是一种永恒的自然规律。

Charles Darwin，生物学家，1859 年

恶性肿瘤的形成是一个很复杂的过程，一般需要经过几十年的时间。正常个体通过演化并逐步发展成具有恶性表型的肿瘤，这一过程称为**癌变进展**。肿瘤可以发生在正常人体的各种组织，并随着机体年龄的增长而增长。由于细胞癌变发生部位的不确定性，导致我们往往只能发现临床上可见的占位性病变。

肿瘤进展是由于 DNA 序列发生了连续的随机突变和后天的改变而产生的，从而影响了基因调控下的细胞增殖、生存，以及与恶性细胞表型相关的其他性状。这一复杂的过程反映了进化过程的另一功能，即在正常细胞和肿瘤细胞衍生物之间建立了一系列的屏障。因此，肿瘤进展过程中所完成的每一步都可以看作是癌前细胞克隆性生长屏障被破坏的过程。

这些阻碍癌前细胞克隆性生长的屏障可以看作是生物进化的一种形式。或者我们可以这样理解，生物进化的主要特点就是设计并构建了多细胞生物的结构和生理功能，并具有不断完善和修复的功能，从而可防御细胞异常增殖、降低肿瘤发生的风险。

然而，同时也存在另外一种更可能的设计方式：从大约 6 亿 5 千万年前开始，细胞增殖失控的风险就一直伴随着多细胞生物，其方式是通过给予个体组织细胞一种促进其增殖的能力，即使是简单的多细胞生物或其他组成的细胞，也可能转变成某种蜕变或促发细胞异常增殖，这种增殖失控的细胞称为癌细胞。当然，针对癌症的防御系统也一直伴随着有机生物的进化过程。

前面的大多数章节主要讲述的是肿瘤的发生过程中某种单独的细胞抗癌控制系统。现在我们将这些单独的线索综合起来，看看到底这些系统的改变是如何促进早期肿瘤形成的。我们首先估计了目前所存在的问题的范围，即组织细胞中发生多少不同的连续性改变可以导致人类癌症的产生?

11.1 大多数人类癌症的发生发展需要数十年时间

流行病学调查显示，年龄是癌症发病的一个重要因素。在美国，70 岁的男性死于结肠癌的风险比 10 岁的儿童高大约 1000 倍。这一事实告诉我们，包括这一类型癌症在内的许多其他常见癌症（图 11.1）同样需要经过几年或几十年的发生与发展。这一现象告诉我们，即使消除所有的人类肿瘤，人类的预期寿命也不会因此而延长（信息栏 11.1）。

信息栏 11.1　癌症对人类的寿命的影响　如图 11.1 所示，癌症的发生率是随着年龄的增长而增加的，高龄人群的癌症发生率更令我们感到惊讶和沮丧。癌症所造成的死亡在西方国家人群中较为常见，占总死亡率的 20%，主要是因为各种癌症患者的生存期往往只有短短几年。1990 年荷兰对癌症相关死亡率的研究表明，如果将所有能导致死亡的癌症消灭，那么全世界人口中男性的预期寿命将会延长 3.83 年，而女性则延长 3.38 年（在工业化不发达的国家，传染病在中年人群中占主导地位，对预期寿命的影响则小很多）。

由于大多数癌症主要发生在老年人群中，因此，对于一个年近 80 岁或更高龄的人来说，成功地预防和治疗这一迟发性疾病对他们的生存期影响并不大。相反，虽然西方国家中婴幼儿的死亡率较低，但进一步降低疾病的死亡率对延长人类的预期寿命有着十分重要的意义。除了这两类因素之外，其他疾病如心脏病的死亡率远高于癌症。

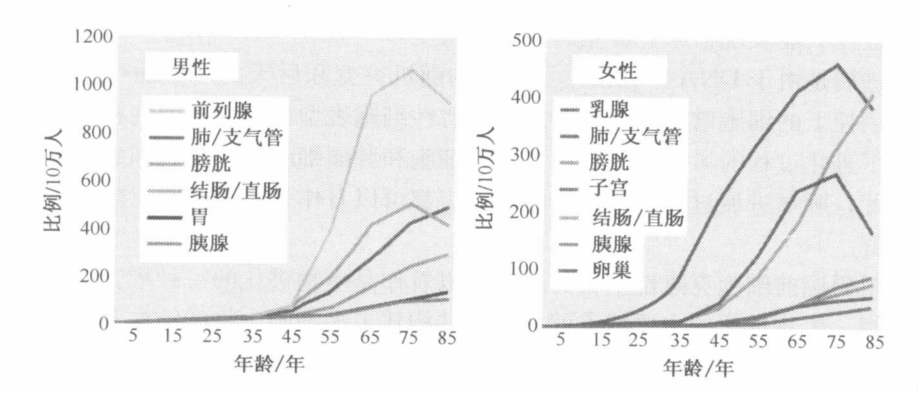


图 11.1　不同年龄阶段的癌症发病率　从图中对各种类型上皮细胞癌的诊断中我们发现随着年龄的增长，癌症的发病率也迅速增加，这提示我们：恶性肿瘤的形成需要经历很长的一段时期。（Courtesy of W. K. Hong. compiled from SEER Cancer Statistics Review.）

这种发病较晚的特点提示我们，大多数癌症的发生发展需要经历一个漫长的阶段。一个更直接的例子就是美国男性的肺癌发病率。第二次世界大战之前，吸烟人口是很少的。第二次世界大战期间，大量男性开始接受这种生活习惯。30 年后，即 20 世纪 70 年代中期，肺癌的发病率开始猛增（图 11.2）。同时，吸烟的习惯开始在全世界范围内传播并在 1990 年达到了顶峰，导致当时全球因肺癌而造成的死亡率超过了每年 110 万人，预计在 2020 年后死亡率将达到高峰。美国以外的其他地区，在吸烟人口的显著增加和肺癌大量的发病之间，存在约 35 年的滞后。

由于大多数癌症发生在生命的晚期，成功地预防或治愈这种晚期发生的疾病对生存期的影响相对较小，或者说，对已经活过 80 岁的人来说意义相对较小。相反，在西方国家，婴儿的死亡率非常低，通过改善条件，更好的减少早期死亡率对全面地延长预期寿命有着更深远的影响。在中年时期，其他疾病如心脏病也是造成死亡的原因之一，但其发病一般较癌症早 10 年或更长时间。

流行病学家已经发展了各种方法预测不同癌症发生的频率，从而作为区分年龄的一种手段。根据癌症类型不同，将疾病的**发病率**和死亡率分为 $a^4 \sim a^7$ 几类，即代表

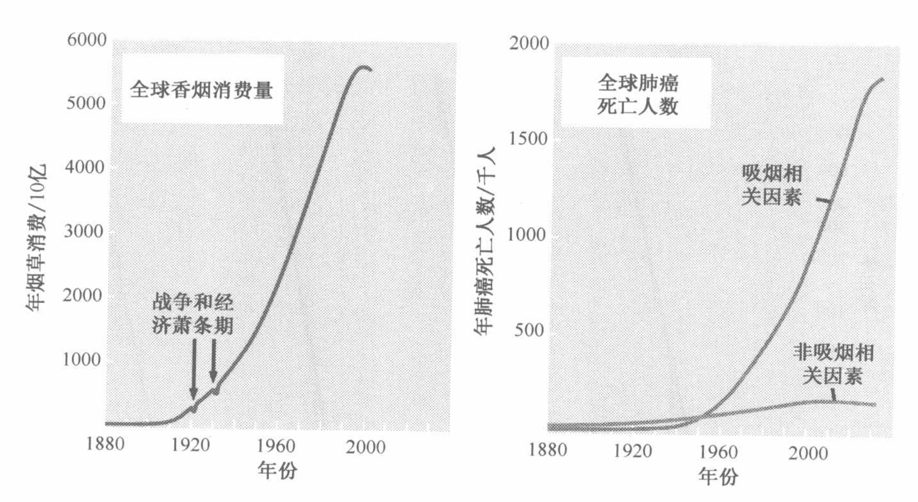


图 11.2　香烟的消费与肺癌　图中两条曲线比较了全球香烟的消费量（红线）与由肺癌造成的死亡率（绿线）的关系。21 世纪 40 或 50 年代，烟草的消费和肺癌相关的死亡率达到了顶峰。右图蓝线显示的则是非肺癌相关的死亡率。(From R. N. Proctor, Nat. Rev. Cancer 1：82-86，2001.)

患者初次诊断的年龄。将所有的上皮细胞癌作为一个整体来说，由于癌症发病率的增加所产生的死亡风险排在第五或第六位（图 11.3）。通过代数学我们可以很容易解释这一现象。用 n 代表产生最终结果的可能性，那么意味着 $n+1$ 这个随机发生并且具有单位时间相对概率的独立事件一定是发生在最终结果之前，这里指已经完成了恶性肿瘤的确诊。事实上一种恶性肿瘤如结肠癌发病率只是发生在出生后 70～80 年才开始增加。说明在每年，这种独立事件的发生可能性是很小的。更特殊的是，每个独立事件在平均 10～15 年间发生一次，而整个连续的事件可能需要 40～60 年才能完成。

以上这些统计只是给我们研究复杂的肿瘤进展提供了比较粗略的估计。事实上，一些关键性的事件可能比其他事件发生得更快。这些利用动力学进行的计算对肿瘤进展过程中变化较慢的，限速的事件有一定影响，而那些变化速度快的事件并没有参与计算。因此，通过使用这种公式得到的实际数据比预计数据要高很多。

从肿瘤进展的动力学角度上我们可以得出肯定的结论：肿瘤的发生是一个复杂的，多阶段的过程。这种关于恶性肿瘤真实发病率的多阶段动力学计算却将肿瘤对人类造成的危害复杂化了（信息栏 11.2）。

信息栏 11.2　肿瘤发生发展的多阶段性使肿瘤流行病学研究变的更为复杂　在不同人群中计算某种恶性肿瘤的真实发病率或死亡率并不是一件简单而又直接的事情。例如，计算每 10 万不同人群中结肠癌的发病率并没有太大的意义，因为其中包含着不同比例的年轻人群和老年人群。显然，老年人群中结肠癌的发病率远远高于年轻人群。

几乎所有的恶性肿瘤的发生率与年龄因素存在着明显的关系，因此，流行病学研究必须考虑到年龄因素的作用，而不同人群中年龄的分布又存在着显著的差异。对年龄相关发病率的计算，正

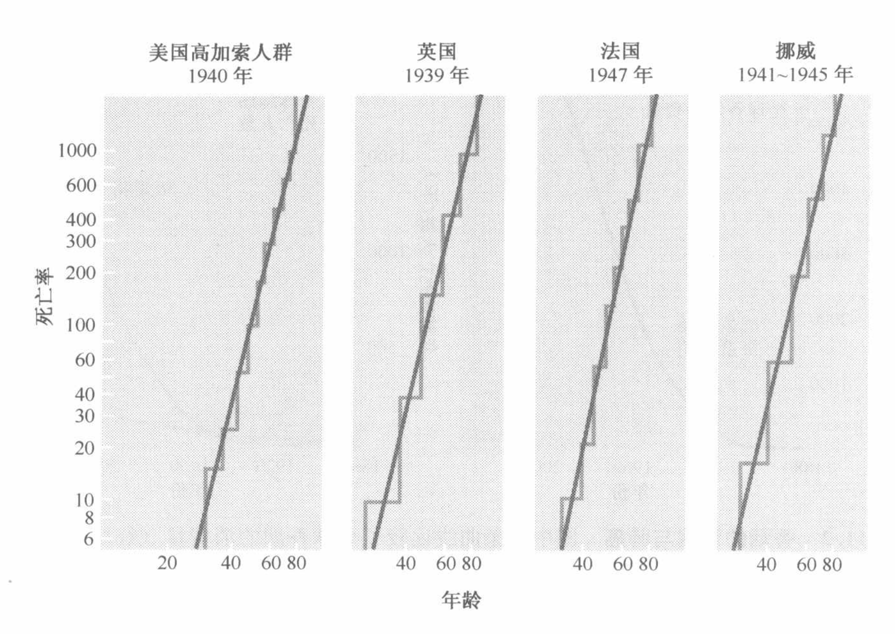


图 11.3　各种上皮细胞癌与死亡年龄的关系　图中显示了以上四个国家从 1939～1947 年之间癌症死亡率的统计数据，而这四个国家在公共卫生统计学研究方面一直保持着很高的水平。其中男性癌症患者不同年龄阶段（横坐标）的死亡率（每 10 万人，纵坐标）在以上图表中存在特定的斜率（倾斜度），这一特点提示我们：一个致命性的癌症的产生需要完成 5～6 个限速事件。例如，如果斜率为 5 可以反映 6 个限速事件。更有趣的是，同一类型的癌症死亡率的斜率在不同的国家是相似的，而不同类型的癌症死亡率则具有不同的斜率。(From A. G. Knudson，Nat. Rev. Cancer 1:157-162，2001，reproduced from C. E. Nordling，Brit. J. Cancer 6:68-72，1953.)

如比较一个 60 岁美国女性和同一年龄的埃及、哈萨克斯坦、葡萄牙女性乳腺癌发生率的可能性一样。同时，年龄相关性肿瘤发病率的比较研究具有另一个重要意义。在很长一段时间内某一特定人群中，例如对将 1930 年与 1990 年美国年龄相关性结肠癌发病风险进行比较，我们可以发现年龄对于这两类人群结肠癌发病率的影响被消除了。

肿瘤发生的多阶段性结论蕴含了另外一个有趣的观点。设想一下，肿瘤的发生需要具备一系列连续的小概率事件，很多这样的事件频繁地在我们机体内发生。总的来说，这些假设提示我们在变老。事实上，我们机体大量的细胞在不停地衰老，而不是所有的肿瘤细胞都会衰老。绝大多数的人不会完成所有程序设定的事件（我们会因为其他疾病而死亡），因此我们很难意识到肿瘤已经在我们机体内生长了。由此可见，肿瘤的产生是不可避免的事件。如果我们成功地避免了各种疾病带来的死亡，那么我们迟早将成为癌症的牺牲品。

当然，不是所有人都能患某种肿瘤疾病，如结肠癌。这就是另外的一种可能：a^5 或 a^6 的表达可以预言在大规模人群中结肠癌的发病率。这种可能的限速致病事件在单位时间内从一个个体到另一个体之间发生变化，并受到遗传因素、饮食、生活习惯和其他变量的影响，因而影响结肠癌在人群中的发生率。

流行病学从另一个角度给我们提供了多阶段致瘤的重要证据。当我们观察人间皮瘤

（大多数由接触石棉或吸烟引起）和小鼠皮肤癌（反复的苯芘类试剂涂抹引起）的发生频率时，可以发现这些肿瘤的形成需要经历很长一段时间反复的致癌物暴露，并且暴露的持续时间决定了疾病的周期（图 11.4）。在这里，肿瘤的发生是由外源性的致癌物质导致的，而不是由机体自发产生的。这些致癌物质加速了肿瘤的演进，并且这些肿瘤的发病机制都包括一个在肿瘤发生之前就已经预先设定好了的暴露间期。

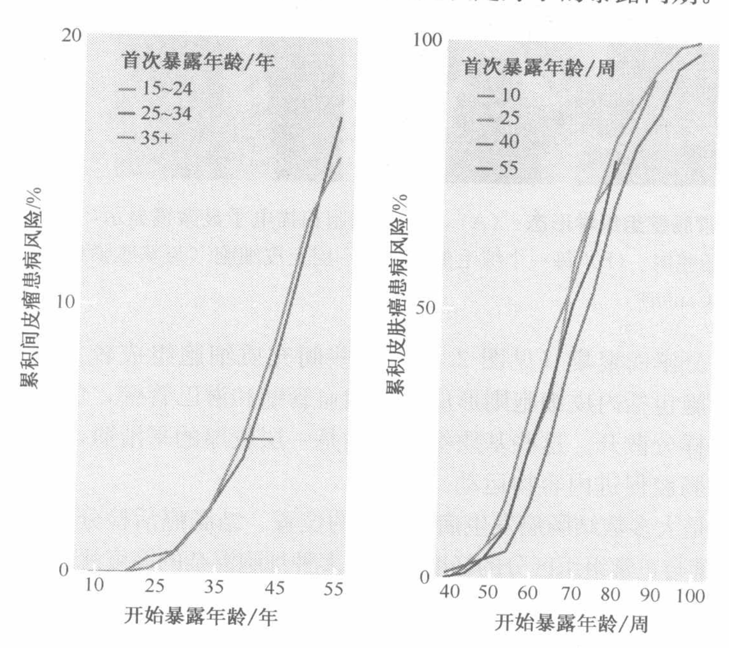


图 11.4　癌症的发病率与致癌物暴露　以上两个图表同时反映了致癌物暴露的累积决定了一种可见的肿瘤发生的可能性，而不是致癌物暴露开始时的年龄。左图描述了间皮瘤在独立的工人中的累积发病风险，而这些工人们的职业即暴露于石棉环境。右图描述了经过实验诱导而导致小鼠皮肤鳞状细胞癌产生的累积风险。(From J. Peto, Nature 411：390-395，2001.)

11.2　多阶段致癌学说的组织病理学依据

病理学家们最擅长通过显微镜对正常或病理组织进行检查。以恶性肿瘤为例，他们可以判断肿瘤的起源及临床分期。正如我们讲到的，组织病理学分析为我们确立的以下观点提供了足够的证据：大多数肿瘤的产生是作为某一复杂而又连续事件的终产物。在这里，我们将再次详细描述组织病理学分析的作用，这就是本章节的核心。

人类肿瘤发生发展的多阶段性概念在肠上皮组织中已经被阐述得很清楚了。胃肠道管腔内的肠上皮细胞形成了由单一细胞构成的分层（图 11.5），并且这些上皮细胞群处于不断变动的状态。每分钟，在十二指肠和结肠内有 2000 万～5000 万细胞死亡并被大量新生细胞取代。

在这些上皮细胞下面的一层膜称为基底膜或基膜，上皮细胞锚定在这些基膜上。在其他一些上皮组织器官中，这些基膜形成细胞外基质的组成部分，并通过上皮细胞和基

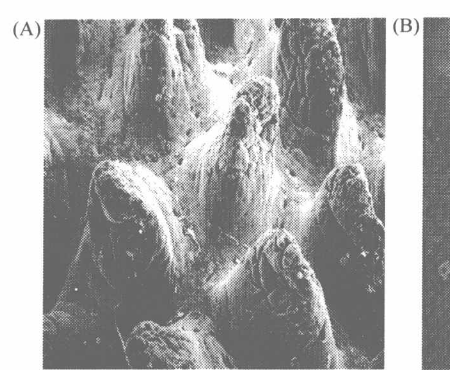
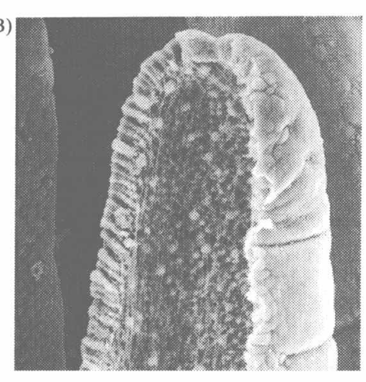



图 11.5 正常肠壁组织学形态 (A) 肠上皮细胞扫描电子显微镜显示，肠黏膜绒毛有规则地延伸至肠腔内。(B) 每一个绒毛都覆盖有一层上皮细胞（与基底膜相分离）。(A and B, from S. Canan)

质细胞的蛋白质分泌而聚集（见图 2.3）。这些间充质细胞组成较大的成纤维细胞群，而其他类型的细胞包括内皮细胞则形成了毛细血管壁和淋巴管壁，免疫细胞如巨噬细胞和肥大细胞也一样分散开。这些基质细胞下面是一层较厚的平滑肌，其主要功能是通过周期性的收缩结肠腔促进内容物运动。

上皮细胞层是大多数结肠癌发生病理变化的位置。结肠癌活检分析可以显示多种组织形态，从几乎很难与正常组织区分的轻度恶变到多种细胞混杂的高度恶变。这种由多种组织形态组成的结构很难与正常肠黏膜（结肠腔内层结构）区分开，逐渐形成高度恶变的组织。

一些增生性病变表现出几乎正常的组织学形态，因此这些个体细胞拥有和正常细胞相同的外观。然而，这些增生区域的上皮细胞具有显著的分裂能力，从而比正常上皮细胞更厚。但是有些其他的赘生物却表现出异常的组织学形态，如结肠黏膜上皮细胞不再形成规则的细胞层，个体细胞经过不同的途径与正常细胞形态学相背离。这些赘生物就被称为发育不良。一些与正常细胞偏离更远的赘生物被称为息肉或腺瘤（见图 2.15 和图 11.6），它们不仅具有发育不良的细胞，而且还拥有一些显著的肥厚标志。在结肠中，不同类型的息肉往往会聚集在一起，其中一些连接在一起组成结肠壁，另一些则通过某一轴与结肠壁相连。重要的是，这些赘生物通常被认为是良性的，因为它们都没有突破基底膜而浸润到黏膜下层组织。

突破基底膜并向下浸润的异常赘生物即为恶性组织。更具侵袭性的结肠癌与癌相关细胞是有区别的，主要在于细胞是否穿透间质层到达平滑肌层和是否在解剖学位置上发生转移而形成新的肿瘤细胞群体。

将这些演进中的组织表型从正常发展到具有侵袭性进行排序（图 11.6），我们可以看到这种演进过程精确地描述了结肠中肿瘤发展的实际情况。事实上，有很多证据可以间接地证明这一演化过程。有些肿瘤可能以一系列的过度生长物形式发展。或者，可能一些组织类型是作为在这一连续性过程中走向死亡的中间产物，而不是发展成更恶性的肿瘤。在一些结肠癌的病例中，也同样存在这种可能，肿瘤的进展依赖于生长物跳过中间产物直接达到更高恶性度终产物的能力，这种方式比上述演进过程要快得多。其他一些上皮细胞癌也同样具有类似的演进过程（图 11.7）。

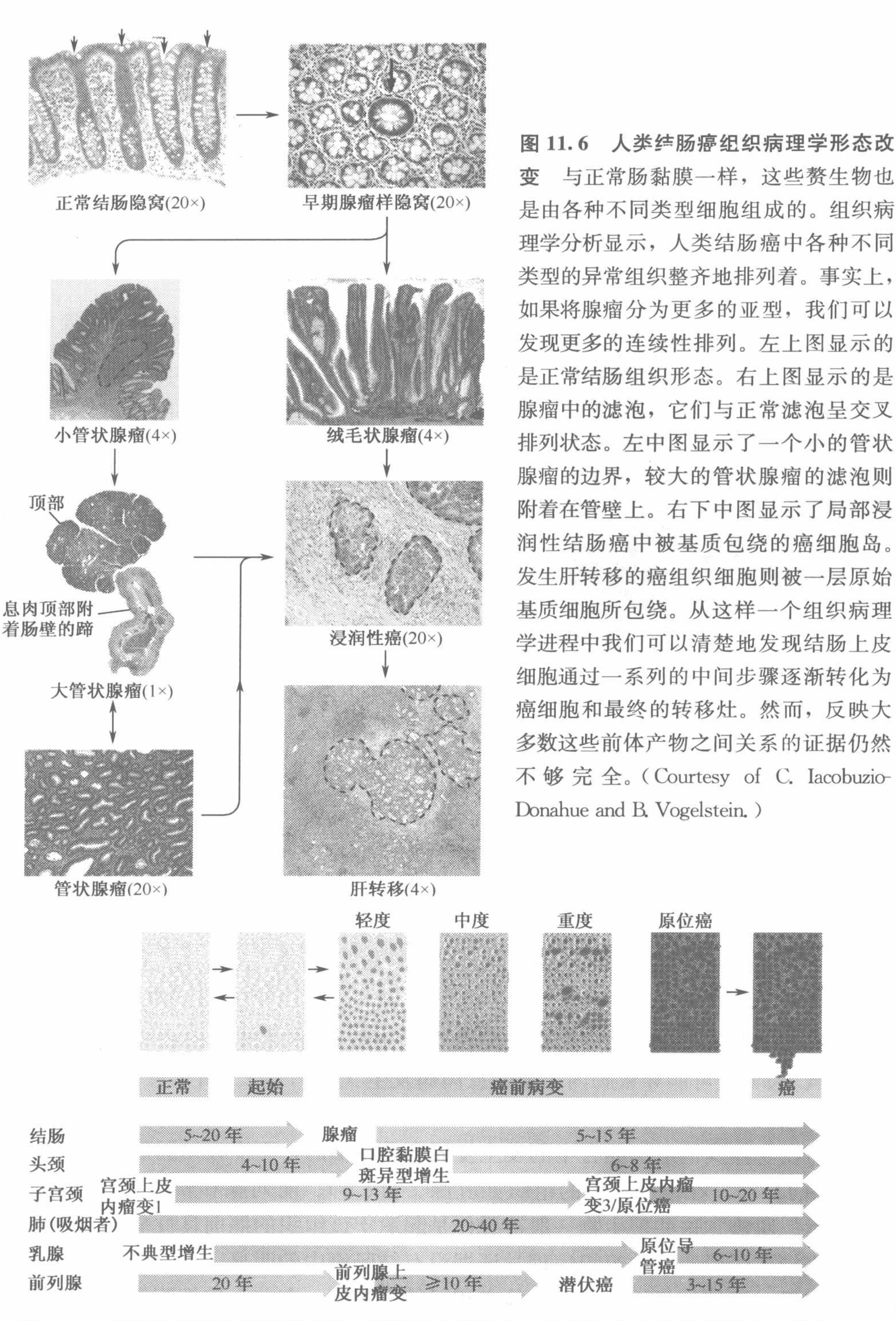
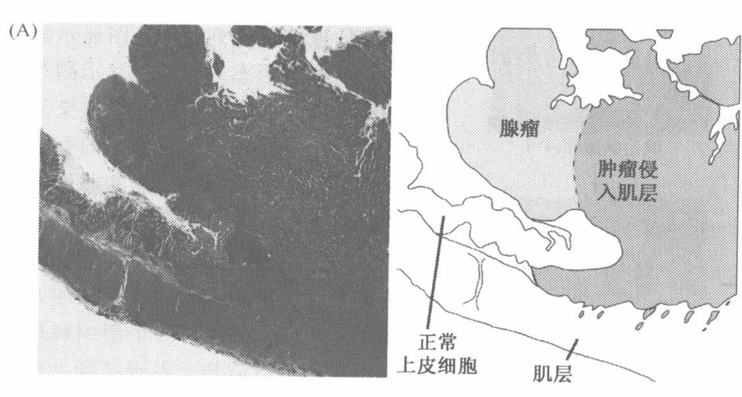


图 11.6　人类结肠癌组织病理学形态改变　与正常肠黏膜一样，这些赘生物也是由各种不同类型细胞组成的。组织病理学分析显示，人类结肠癌中各种不同类型的异常组织整齐地排列着。事实上，如果将腺瘤分为更多的亚型，我们可以发现更多的连续性排列。左上图显示的是正常结肠组织形态。右上图显示的是腺瘤中的滤泡，它们与正常滤泡呈交叉排列状态。左中图显示了一个小的管状腺瘤的边界，较大的管状腺瘤的滤泡则附着在管壁上。右下中图显示了局部浸润性结肠癌中被基质包绕的癌细胞岛。发生肝转移的癌组织细胞则被一层原始基质细胞所包绕。从这样一个组织病理学进程中我们可以清楚地发现结肠上皮细胞通过一系列的中间步骤逐渐转化为癌细胞和最终的转移灶。然而，反映大多数这些前体产物之间关系的证据仍然不够完全。(Courtesy of C. Iacobuzio-Donahue and B. Vogelstein.)

图 11.7　不同组织器官多阶段致瘤　不同上皮组织中一些相似的生物学机制反映了癌症的发病机理。因此，多阶段致瘤假说同样也包含各种组织实体一些相似的病理性途径。由于在不同的组织如原位癌、宫颈癌、输卵管癌和前列腺癌中使用的专业术语大不相同，因此这些相似性很难被区别。

至少有三个证据有力支持结肠腺瘤和结肠癌之间前产物的相互关系。首先，在一些极少的情况下，可以直接观察到息肉向癌转变的过程（图 11.8A）。我们可以推测，在所有结肠癌发生发展过程中均存在这样的赘生物形成，并且更常见的情况是随着肿瘤的迅速生长，腺瘤组织逐渐被癌组织所取代。

其次，临床研究通过对大量患者进行结肠镜检查，从而检查和偶然切除腺瘤性息肉（图 11.8B）。在这些患者中，至少 80%的结肠癌是由早期可检测到的腺瘤形成的；由于结肠镜检查可能会漏检部分息肉，因此实际的比例应该会更高（这些观察仍然不足以证明每个单独的结肠癌都是由早期的腺瘤形成的）。



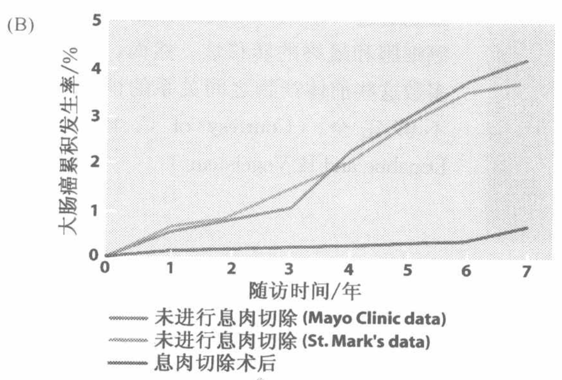


图 11.8 腺瘤转变成癌的证据 腺瘤向癌转变的证据至少可以通过以下两类临床检测发现：(A) 癌组织直接从腺瘤组织中生长出来。我们可以准确地区分腺瘤和癌组织。(B) 第二个证据可以通过临床对上大量患者进行结肠镜检查获得。通过息肉切除手术，我们清除了临床上可见的息肉组织（外科手术）。B 图中，两个相互独立的研究（黄-橙线，蓝线）同时对这些人群中癌症发生数量进行了预测。结果发现，经过结肠息肉手术后的患者中结直肠癌的发病数量在接下来的时间内比没有手术的患者减少了 80%（红线）。（A，courtesy of Paul Edwards；B，courtesy of W. K. Hong，data from S. Winawer，A. G. Zauber，M. N. Ho et al.，N. Engl. J. Med. 329：1977-1981，1993.）

第三个证据就是家族性腺瘤样息肉病（7.11 节），在家族性腺瘤样息肉病中，抑癌基因 APC 的突变可能导致肠内大量的息肉病发生（图 7.22）。由于息肉病的检出率低，因此某个息肉即自然地转化为癌症。这种说法可以解释这些个体结肠癌高发的原因。

癌症在身体其他组织器官中的发生发展也是相似的，至少在结肠癌中存在多阶段的过程（图 11.7）。在很多其他的组织如乳腺、胃、肺、前列腺和胰腺中同样存在增生、异型增生、腺瘤。这些赘生物一般被看作是起源于该组织的癌前良性病变。但是，这些组织中支持多阶段致瘤的组织病理学证据没有结肠癌中的明显。因为结肠镜检的结果更容易被接受，而其他组织的病理学检查相对较难辨别。在非上皮细胞组织中，包括神经系统、结缔组织和造血系统，更难通过组织病理学证据证明多阶段致瘤假说。

事实上，癌前病变和恶性赘生物的病理形态学改变其实就是肿瘤组织亚细胞结构改变的一种反映。在癌症病例中，上皮组织的改变被看作是肿瘤进展和组织形态学改变的

起始。肿瘤组织特别是胃组织中的一些其他类型的细胞通常被认为是一种近似正常的细胞，由于它们的聚集而形成肿块，进而与异常的细胞一起作用促进肿瘤的形成。这类近似正常的细胞在肿瘤形成过程中的作用是非常复杂而有趣的，参见第 13 章。

11.3　基因变异累积与肿瘤的进展

以上几个章节从组织病理学角度详细描述了不同组织中肿瘤进展的过程。后天的遗传学改变促进了细胞和组织中表型变化的累积，从而促进了肿瘤的发生与发展。例如，肿瘤进展过程中的某一些步骤可能解释正常胚胎发生过程中一些特殊的细胞行为学改变。我们知道，事实上胚胎学发展所有步骤都是基于基因程序性表达的改变，而不是基因组自身的改变（克隆羊多利的诞生正好证明了这点，即高分化的乳腺上皮细胞基因组与最近的受精卵基因组是相同的）。

根据这种改变模式，我们可以推断，大多数肿瘤进展的过程是由肿瘤细胞基因组改变的积累所驱动的。通过过去几十年已经积累的大量证据，我们可以进行如下设想，即细胞内突变基因数量的增加导致细胞从良性转变为恶性。我们已经在前面几个章节列举了大量这样的突变基因。

这种遗传学和表型的共同进展可以最好的解释人类结肠癌。我们已经知道了大量肿瘤发生发展的遗传学基础。结肠癌是西方国家常见的一类肿瘤的发生，我们能够通过结肠镜检查很容易地收集并且研究结肠癌样本中癌前病变和恶性增生物。美国马里兰州 Johns Hopkins 医科大学的研究人员主要研究的就是肿瘤与遗传起源的关系。

这些研究人员已经收集了足够的证据表明等位基因的突变如 *ras* 和 *p53* 的突变有助于体外环境下细胞的转化。因此他们开始研究是否能够通过检测小型结肠腺瘤，中型结肠腺瘤，大型结肠腺瘤与结肠癌中细胞基因组变异来寻找与体内转化相关的因素。结肠组织一步步从正常转变为高度恶性的过程似乎是可以理解的，这些变异组织中的上皮细胞不断地累积各种基因突变的发生。

以上这些都是 20 世纪 80 年代晚期科学家们的发现，他们主要检测了以 K-*ras* 为主的原癌基因和其他一些抑癌基因。事实上，在他们早期的研究中并没有发现肿瘤抑癌基因也参与结肠癌的发病机制，因此他们寻找了肿瘤发生过程中染色体区的一些杂合性缺失位点。他们在一个特殊的染色体区域内发现的一个高杂合性缺失位点证明了这些区域隐藏了某些抑癌基因，并且利用杂合性缺失的方法分离出了肿瘤细胞染色体中完整的等位基因（7.4 节）。

在确定缺失位点的工位中，研究发现早期的腺瘤通常表现出 5 号染色体长臂的杂合性缺失。几乎一半的小型腺瘤都携带一个突变的 K-*ras* 癌基因，而较大的腺瘤则在 18 号染色体长臂有高频率的杂合性缺失；另一半则显示第 17 号染色体短臂的杂合性缺失（图 11.9，图 7.14）。

以上这些研究足以证明在肿瘤进展的过程中上皮细胞在不断地获得各种新的生物表型，基因组显示其改变的基因位点数量在不断增加。同样重要的是，这些改变同时包括原癌基因（如 K-*ras*）的活化和抑癌基因（至少 3 个直接相关的抑癌基因）的失活。这是第一次报道并且现在已经得到认可的观点：人类肿瘤细胞基因组中抑癌基因失活的数

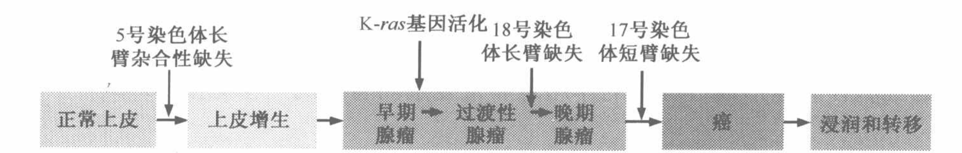


图 11.9 结肠癌进展与染色体杂合性缺失 将不同阶段的结肠癌组织样品的 DNA 提取后，进行杂合性缺失分析（图 7.14）。一般来说，患者正常组织细胞中每条染色体臂上杂合性缺失形式都可以反映一个或多个遗传学特性。随着肿瘤的进展，结肠上皮细胞染色体臂上杂合性缺失数量逐渐增加。某些染色体区域杂合性缺失频率非常高，提示我们某些抑癌基因通过杂合性缺失机制而失活。（Adapted form B. Vogelstein，E. R. Fearon，S. E. Kern et al.，Science 244：207-211，1989.）

量远远超过原癌基因活化的数量。

随着遗传学进展的发展，第 5 号和第 17 号染色体杂合性缺失位点得到了鉴定（图 11.10）。染色体 5q21 基因杂合性缺失区域发现了 *APC* 基因（一种抑癌基因，见图 7.11），而染色体 17p13 被确定为 *p53* 抑癌基因的所在区域（第 9 章）。结肠癌发生发展过程中第 18 号染色体长臂失活的原因仍然未明。60%的人类结肠癌在这一染色体区域存在杂合性缺失，而抑癌基因 *DPC4*/*MADH4* 就在这一区域。其表达的特异性蛋白 Smad4 能将生长抑制信号从 TGF-β 受体传递至细胞核（6.12 节）。然而，结肠癌中 *DPC4*/*MADH4* 的拷贝数低于 15%；其次，其特异性表达蛋白 Smad2 失活频率大大提高。在大多数人类肿瘤中，位于第 18 号染色体长臂上抑癌基因失活和杂合性缺失靶点的鉴定是一个需要探索的问题。

最好的理论来解释结肠癌发生发展过程包括遗传学改变和上皮细胞恶性转化（图 11.10）。事实上，图中描述了特异性序列的遗传学改变和结肠癌发生发展的关系。这些结肠癌中突变基因或染色体区域的遗传学改变数量是可以计算的。大约 90%结肠癌在进展的早期有 5 号染色体长臂 *APC* 基因的失活，而只有 40%～50%的 K-*ras* 基因突变，50%～70%第 17 号染色体显示有杂合性缺失，60%显示 18 号染色体长臂杂合性缺失。另外，大约有 12%的结肠癌存在导致 TGF-βⅡ受体失活的突变。

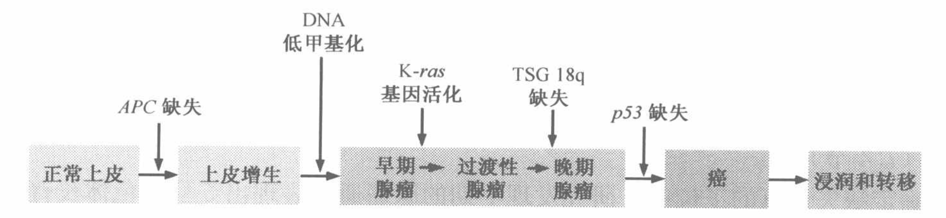


图 11.10 抑癌基因与结肠癌进展 染色体区域杂合性缺失（图 11.9）可能导致抑癌基因的失活。位于 5 号染色体长臂的 *APC* 基因和位于 17 号染色体短臂的 *p53* 基因就是这类由于杂合性缺失机制而导致失活的抑癌基因。而被证实位于 18 号染色体长臂的另一个基因是否发生了杂合性缺失还不明确。另外，大约有一半的结肠癌发生了基因突变，如 K-*ras* 等位基因的活化、基因组改变、癌前生长物的低甲基化。而低甲基化的作用机制还不明确；某些证据显示低甲基化可能导致染色体的不稳定性增加。

大多数结肠癌发生发展的早期有第 5 号染色体的改变，随后朝着全面恶化的方向发展（图 11.11A）。通过这些机制，我们可以推测出发生了遗传学改变的基因数量。这种说法看起来是合理。例如，由于那些结肠癌不能获得突变的 K-*ras* 癌基因，因此转向 Ras 信号通路上的其他基因。可以推测，这些选择性的突变参照了细胞生理学的特点并导致了突变体的形成，进而激活了 K-*ras* 基因。

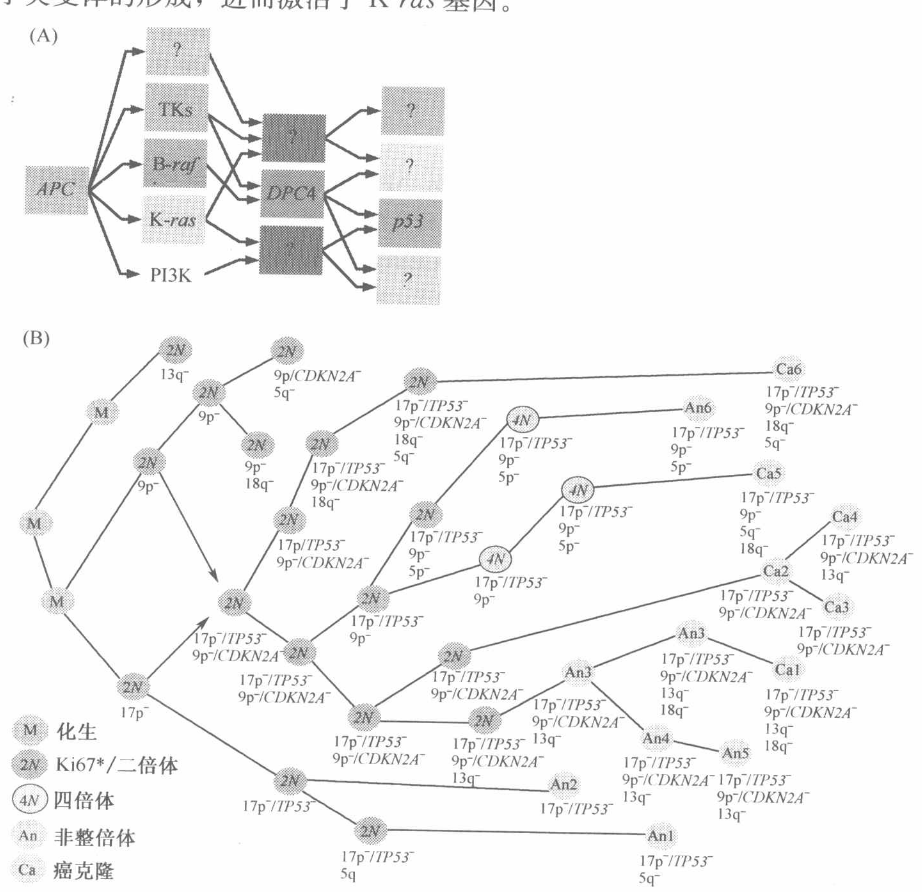


图 11.11　肿瘤进展过程中的选择性遗传途径　（A）图 11.10 中显示的一系列的遗传学改变并不能代表所有的结肠癌中都具有不变的序列和遗传学途径。APC 功能的缺失代表了几乎所有人类结肠癌发生发展的一个起点。然而，接下来的基因改变是不确定的，发生改变的顺序也是不同的。这使得我们这里所描述的肿瘤进展中的选择性途径成为了一种可能。除此之外，人类结肠癌发生发展过程中确切的选择性遗传途径的数量是未知的，可能比我们这里所描述的四种途径要更多。（B）Barrett 食管是食管癌的癌前病变，对于人类 Barrett 食管的详细研究（见图 2.13）有助于我们发现食管癌发生发展过程中更多数量的选择性遗传途径。这里所说描述的改变包括染色体数量的变化，杂合性缺失和由于启动子甲基化所导致的抑癌基因功能丧失。例如，S 期 Ki67 的阳性表达所致的细胞增殖，9 号染色体短臂 *CDKN2A* 基因的突变，2 倍体和 4 倍体的形成。（B, from M. T. Barrett, C. A. Sanchez, L. J. Prevo et al., Nat. Genet. 22：106-109，1999.）

这种推测在 35 例结直肠癌病例全基因组中的 90 个激酶基因序列中得到了证实。这些分析显示大约有 15%的肿瘤包含有突变体，并可能激活酪氨酸激酶；另一个遗传学研究报道，大约 1/3 的结直肠癌中突变体形成了 110kDa 的 PI3 激酶亚单位。结肠息肉的研究表明，缺乏有活性的 K-*ras* 基因的生长物中通常包含有突变体；而癌基因 B-*raf*

编码丝，苏氨酸激酶。显然，突变体 *ras* 和 *raf* 癌基因是相互排斥的，两者不可能同时在同一息肉中发现。在结肠癌的发生发展过程中，这些变异的突变体激酶是为 K-*ras* 癌蛋白提供各种选择性功能因子的最优替代物。

Johns Hopkins 大学的研究人员提出的四类改变方式是正确的，即使肿瘤进展的过程已经很明确，但是也不一定都按照图 11.10 中所描述的顺序发生。第 5 号染色体长臂的杂合性缺失是最早的步骤，但是具体的序列改变顺序在不同的肿瘤中可能各不相同。*APC* 基因的失活作为最早先的遗传学改变而导致癌症产生，这种原则看起来是一种独特的生物学效应（信息栏 11.3）。

信息栏 11.3　结肠腺泡的聚集可以解释为什么 APC 缺失发生在结肠癌进展的早期

正如前面章节（7.11 节）所描述的，一旦正常结肠内胚层形成，它们则向结肠腺泡外发生迁移，分化并且在 3～4 天后发生程序性细胞死亡。由于这些细胞迅速的死亡，结果使得细胞中那些对基因组造成重大危害的突变也随之消失。由于 APC 功能的缺失，结果导致结肠癌腺体中细胞的捕获和 APC 阴性的细胞的聚集（少数结直肠肿瘤表达一种抗降解的突变型 β-连环蛋白，从而产生了与 APC 的缺失具有相似的生物化学状态）。因为内胚层的迁移被阻断，使得上述这些细胞和其子代细胞不断积累突变，结果导致突变细胞在腺体内得以存活。但是，我们并不能通过相似的理论去理解为什么结肠癌发生发展过程中其他基因（*ras*、*p53* 和 *DPC4/MADH4*）的突变发生在某一特定的时期，或者说某一段特殊的序列发生突变。事实上，这些其他的基因序列发生的突变在不同的恶性肿瘤中是各不相同的。

最后，我们应该明确，各种不同的遗传学改变并不代表发生变化的基因数量的上限，这些变化在结肠癌形成的各种重要途径中具有重要的作用。例如，4 个染色体区域的遗传学分析类型中只有抑癌基因杂合性缺失在肿瘤的发生发展过程中具有明显的发生频率。因此，杂合性缺失事件在所收集的肿瘤样本中低频率的发生则不在分析范围之内，尽管这些事件可能导致基因组中重要的功能性抑癌基因的失活。

表观遗传事件如启动子甲基化和去甲基化在肿瘤的发生发展过程中也可能具有重要的作用。最近，有证据显示，低甲基化对早期可以检测到的腺瘤形成也具有重要作用，而不是依赖其基因表达值的变化（图 11.10）。通过一些未知的机制，低甲基化可以导致染色体的稳定性降低。

如同这本关于结肠癌发生发展的《遗传学论著》中所描述的（图 11.10），对种类型肿瘤最理想的描述应该保持相似或一致，而本论著应该包含其特殊的癌基因和抑癌基因，然而只有少量这样的描述（图 11.11B）被报道。这就意味着在当前，我们还不能够通过列举出肿瘤细胞基因组的遗传学改变来完全阐明肿瘤多阶段发生发展的规律。随着各种高效、灵敏研究工具的发展及在肿瘤细胞基因组分析中的运用，更多关于各种肿瘤遗传学的论著在不久的将来出版。

11.4　家族性结肠息肉癌变的多阶段模型

以上讲述的遗传学途径和突变理论描述了大量单个结肠癌发病机制中的遗传学事件。这些肿瘤发生在一些个体的结肠内，而这些个体的基因型在受精卵均为野生型。在结肠癌发生发展的过程中，结肠上皮细胞中的体细胞突变（或甲基化事件）逐渐改变了原来野生型的基因组，从而导致正常结肠上皮细胞逐渐转变为恶性的结肠癌细胞。

在这些复杂的多阶段致瘤理论中，都描述一种复杂的防御机制，这种防御机制能阻止肿瘤在正常组织中的产生。由于这些防御机制受到了阻碍和干扰，从而导致细胞的进化最终走向了完全的恶性变。

人的机体在一生中不断地产生着大量的结肠上皮细胞，由于这种防御机制的存在，散发的结肠癌发病率非常低。而事实上，结肠癌仍然发生在少数的个体，正如前面章节所描述的。*APC* 抑癌基因等位基因的突变体可以导致个体产生十个、百个甚至上千个结肠息肉——家族性腺瘤性息肉病综合征。

所有的结肠癌进展的早期都包括 *APC* 基因的失活——同样的基因以突变体的形式在家族性肠息肉综合征家族个体中遗传。现在，我们便可以理解为什么一个 *APC* 突变体的遗传能导致结肠息肉和结肠癌的产生了：结肠癌发生发展的第一步包括了 *APC* 基因的失活，而每一个结肠上皮细胞都表现为 $APC^{+/-}$，而不是 $APC^{+/+}$。

在家族性结肠息肉病的每个个体中，每一代细胞至少有上百个结肠癌上皮细胞由于杂合性缺失而导致所有的 APC 功能失活，基因型向 $APC^{-/-}$ 状态发展。每个这样的 APC 阴性的细胞都可能发展为息肉病，一旦息肉形成（可能为几百分之一），则极有可能向癌症发展。结果，一种先天易感性机制加速了多阶段致瘤步骤，而限速步骤已经不再依靠体细胞的随机突变了（因为已经在干细胞系内产生了）。

组织器官由于散发肿瘤偶然的出芽现象而产生独立起源的肿瘤现象称为**区域性癌变**。这些复杂的赘生物具有相似性，至少在肿瘤的易感性方面基本相似，如对家族性息肉的易感性。实际上，一个独特的突变包含在这种复杂的、独立的赘生物中。但是在这里，遗传学改变是由体细胞突变造成的（补充材料 16 ◎）。

11.5 肿瘤进展符合达尔文进化论的规律

Johns Hopkins 大学的研究人员发现了肿瘤进展中伴随的组织病理学变化与结肠黏膜基因组的遗传改变具有相关性。更重要的是，人们开始认为这些遗传改变是导致这些细胞和组织表型进化的内在原因。

早在数年前，其他一些人认为可以用类似达尔文进化的生物学过程来理解肿瘤的进展。人类结肠癌遗传分析的结果进一步提供证据支持这一模型（尽管达尔文本人事实上对基因和遗传学一无所知，“现代版本”的达尔文理论将孟德尔遗传和群体遗传引入了达尔文最先提出的进化过程中）。

在肿瘤进展过程中，进化单位是细胞群体中互相竞争的个体细胞，而不是种群中互相竞争的生物个体。类似于达尔文进化的现代化描述，我们推断随机突变可以在细胞群体中创造遗传变异性。一旦一个遗传异质群体出现，选择的力量倾向于让那些由于基因突变携带优势性状的个体细胞（以及它们的子代细胞）生存，特别是在组织微环境中具备增殖和生存优势等性状的细胞。

将达尔文理论和多步骤癌变的假说结合起来，研究人员认为癌变是一系列的克隆增殖。整个框架是这样的：一个随机突变使得一个细胞具有明显的生长和（或）生存优势。这个细胞及它的子代与它们的近邻相比增殖更加高效，最终产生一个较大的克隆性群体。这个群体支配了整个组织并排除其他遗传上不占优势的细胞。或早

或晚，这个细胞克隆会达到足够大（如 10^6 个细胞），使另一个优势突变发生在该细胞或者该细胞克隆中的另一个细胞，这些突变以大约每 10^6 细胞发生 1 次的概率随机发生（图 11.12）。

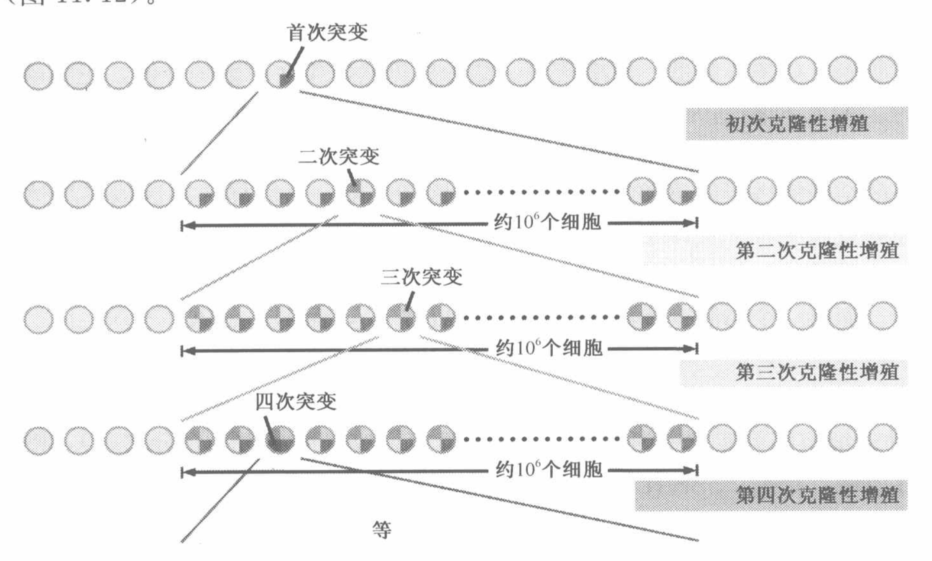


图 11.12　达尔文进化和克隆演变　达尔文进化论认为被赋予优势基因型乃至表型的个体有机会大量繁殖；一个相似的理论似乎可以解释肿瘤的进展。一个大的细胞群中某个细胞发生了一个初始突变（红色部分，上），这个突变使它与缺乏此突变的细胞相比有增殖和（或）生存优势。最终，排除缺乏此突变的细胞。这个突变细胞的克隆后代在局部区域占优势，及出现第一次克隆增殖。当此克隆达到一个足够数量（如 10^6 个细胞）的时候，以 10^{-6}/个细胞的频率发生的二次突变（绿色部分）就会发生，产生一个具有更加大增殖优势和生存优势的双重突变细胞。克隆增殖的过程不断重复，新的突变群体不断取代先前形成的克隆群体。这再次产生了一个更大的子群体，子群体的细胞携带三次突变（蓝色部分），以此类推。

这个双重突变的细胞将比它的 10^6 个克隆同伴具有更加有效的增殖（或者生存）能力，从而形成一个最终在整个局部组织环境占据主导的新的亚克隆。新的亚克隆逐渐排除它所来源的前体细胞群。当这个双重突变细胞克隆达到足够大小时（如前），第三个突变可能会发生从而使克隆增殖和演变的过程不断重复。很可能连续 4～6 次这样的克隆演变就足够解释肿瘤进展在细胞和遗传水平上是如何发生的，每个这样的演变都是由一个特定的突变驱动的。

可以肯定的是肿瘤进展的达尔文模型过分简单化。例如，这个模型需要经过修正才能解释以下发现：基因的表观遗传学改变（如启动子甲基化，见 7.8 节）在抑癌基因失活的过程中起重要作用（这里我们面临肿瘤进展和达尔文进化间一个较大的差别，因为没有人证实表观遗传改变可以驱动物种的进化，如 DNA 甲基化事件与进化的关系）。

这个框架在其他方面同样是过分简单化的。因此，仅仅计算肿瘤进展过程中改变的遗传位点数目可能会低估肿瘤进展过程中不同步骤的数目。在第 7 章中已经讨论了一个抑癌基因的失活通常是两个步骤的过程。首先，一个等位基因由于突变（或者甲基化）失活（LOH）。接着，剩下的完好的等位基因通过杂合子丢失的过程被清除。鉴于这个

认识以及抑癌基因失活通常代表了肿瘤进展过程中大部分遗传改变，因此我们推断肿瘤进展中发生的不同遗传改变可能至少是已知基因数目的 2 倍。

由于这些克隆增殖是受一些发生频率较低的遗传或者表观遗传改变（在抑癌基因是一对改变）所触发的，这些增殖的时间跨度可能非常大。在散发性结肠癌发生的过程中，两个关键的遗传改变可能相隔 10 年或者更长时间。在很多个体中，整个过程可能会跨越一个世纪（例如，其中一个关键步骤——从息肉到侵袭性癌，估计需要 4～11 年，取决于息肉中异常增殖的程度）。然而，很显然有一些人在很短时间里就出现散发结肠癌，因此在这些个体中这个过程可能被缩短了。

对于大多数组织，我们对决定肿瘤进展速率的因素几乎一无所知。在结肠癌的例子中，食物中的某些组分可能会大大的增加结肠上皮细胞累积突变的速率（信息栏 11.4）。这些增加的突变速率反过来可以缩短克隆演变的时间。也许对于摄入某些食物的个体，克隆演变仅需 5 年或更短的间期，而不是通常的 10 年或者 20 年。这样，一个通常需要一个世纪才能完成的病理过程可能在 30 年或者 40 年内就完成了，肿瘤的发生处于人类生存期之内。

信息栏 11.4　哪些致癌物与结肠癌相关　不同的国家结肠癌发生率可能相差 20 倍以上。这一差异的主要原因是与环境中的致癌因素相关，而遗传因素的影响较少。有研究结果表明第一代移民结肠癌发病率与所移居国家的人群一致（如图 2.20 所示）。这一点表明，环境致癌物多包含在食物中。

人结肠的致癌物研究是一项高度复杂的工作。据估计，我们摄入的食物包含5000～10 000 种动植物体内自然存在的生物化学物质。另外，定居在人类结肠的数百种细菌以各种复杂方式代谢食物的分解产物，从而使我们胃肠道中不同生化物质的种类更加繁多。这意味着在目前以及将来，我们对饮食和多阶段癌变关系的大部分认识将来自流行病学调查而不是来自结肠内含物分析及其生化、生物学作用机制的研究。

癌前病变细胞的某些遗传改变可能会和外源食物致癌物共同作用加速结肠癌进展。因此，突变的累积可能是由负责维持和修复细胞 DNA 的复杂细胞机制缺陷导致的。例如，在第 12 章中讨论过，有些个体继承了导致细胞 DNA 错配修复功能缺陷的突变。这将引发有缺陷的 DNA 维持机制，最终导致结肠上皮细胞突变速率的增加。突变率的增加会大大加速结肠癌前病变和恶性细胞生长——遗传性非息肉性结肠癌综合征（HNPCC）。然而，更常见的是，肿瘤早期出现的体细胞突变（或启动子甲基化）导致 DNA 修复系统的缺陷；修复机制缺陷和基因组变异进一步加速了结肠癌的进展。这些影响结肠癌形成的因素使我们认识肿瘤进展的达尔文模型所预测的克隆演变变得更加复杂。

11.6　肿瘤干细胞有助于进一步理解达尔文进化模式中的克隆演化和肿瘤进展

克隆演变模型认为一个突变细胞可以产生一个很大的细胞克隆群体，而在这些数目巨大的子代细胞中，一个新的突变事件可以驱动新一轮的克隆增殖（图 11.12）。传统观点认为癌前（或癌）细胞克隆群体中的所有细胞在生物学上是同质的，它们产生新子代克隆的能力是等同的。然而，一些实验结果使研究人员对此产生了怀疑。在这些实验

中，人类肿瘤中的细胞被分为不同的亚型。这些分型主要利用细胞表面蛋白来进行。值得一提的是，利用荧光激活细胞分类术可以分离荧光抗体标记（抗表面蛋白）的肿瘤活细胞（图 11.13）。用这种方法分离的细胞可以以活细胞形式回收并用于生物学实验，包括在体内检测它们在免疫缺陷小鼠的成瘤能力。

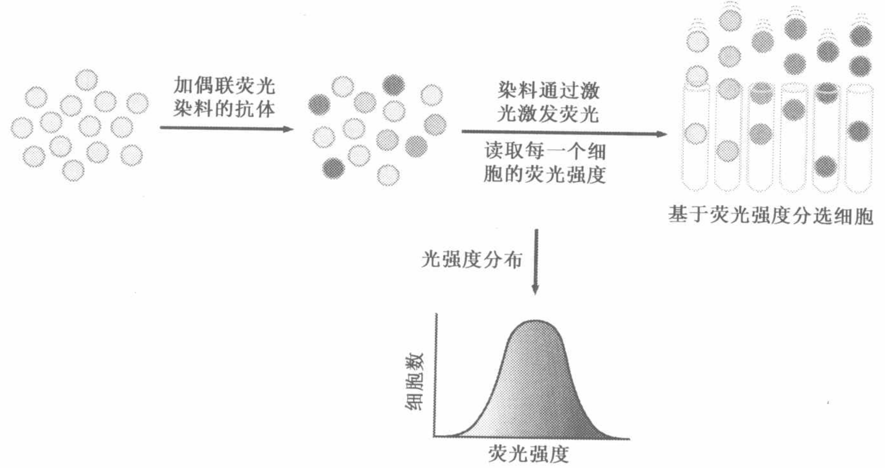


图 11.13　荧光激活细胞分类术　用针对某些细胞表面特定抗原的抗体标记细胞；这个抗体可以结合荧光染料，使得抗原阳性细胞着色。在所分析的细胞中，有些高水平表达该抗原的细胞着色较深（深红），而其他的染色较弱（粉红）或者根本没有着色（灰色）。处于悬浮状态的细胞混合物单行通过能够激活染料（导致染料发光）的激光束和检测细胞表面染料分子荧光发射强度的光电管。这些测量结果被整合并绘制信号分布图，这种情况下荧光激活细胞分类术又称为“流式细胞术”（以下）。如果标记操作并未损伤细胞，可以基于它们的荧光强度对它们进行分离（如通过电场）。这样，这些细胞的生物特性就可以通过其他方法检测（右）。通常，携带不同荧光染料的两种不同抗体的染色强度允许我们对两种不同抗原同时检测，但是这需要一种不同的作图方法，见图 11.14。用这种方法得到的荧光强度通常用对数方法作图。

最初，在其中的一个实验中，研究人员使用 FACS 方法将 AML 分为多数和少数两个细胞群体；少数群体细胞只占不到 1%。5000 个左右的这类细胞注射入宿主小鼠体内就可以形成新的肿瘤，因此被认为具有“成瘤性”；相反，来自多数细胞群体的 500 000 个细胞却不能形成肿瘤。更重要的是，多数细胞群体中的细胞展现了分化粒细胞或单核细胞的很多特性，但增殖能力有限。这些结果提供的具有说服力的证据表明，AML 肿瘤由两种类型的细胞组成，小部分是具有自我更新能力的成瘤细胞，大部分是不具有增殖能力或仅有很小增殖能力的分化细胞。

随后将这些结果扩展到从实体瘤中直接分离人乳腺癌细胞。在这些实验中，少数群体的成瘤细胞仅占所有肿瘤细胞的 2%。数百个这样的细胞注射入宿主鼠体内后能形成肿瘤，而高达 20 000 个的大细胞群体却不能形成肿瘤（图 11.14）。更重要的是，两种细胞群体中处于增殖周期的细胞比例相同，并且两种细胞群体都能从原发实体肿瘤中与非肿瘤细胞（如间质细胞）进行分离。

小群体细胞接种后最终产生的肿瘤同样由大、小两个细胞群体组成。和原先一样，这两种类型的细胞成瘤性有极大的差异。对脑肿瘤的研究也得到相似的结果（图

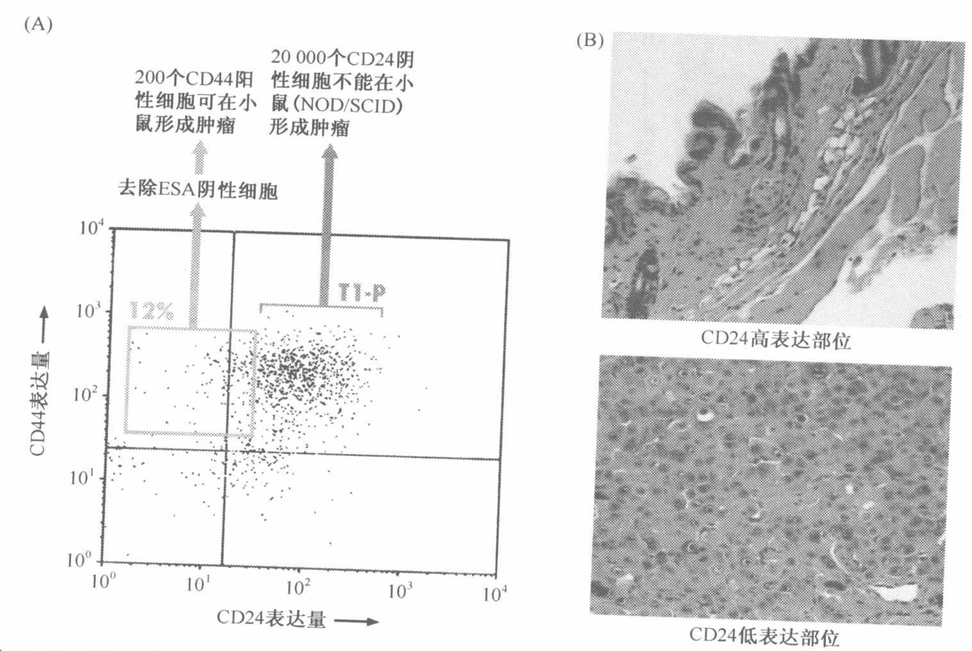


图 11.14　乳腺癌干细胞增生　(A) 人类乳腺癌转移细胞与其他非癌细胞不同，也与那些荧光激活细胞有区别（图 11.13）。它们同时表达两种不同的细胞表面抗原——CD24 和 CD44，并可以分别通过不同的荧光染料检测到一种特异的单克隆抗体。我们将着色荧光强度绘制成对数表，表中的每个黑点代表单个细胞的检测值。在这些实验中，12%低表达 CD24，高表达 CD44 的细胞与高表达 CD24 和高表达 CD44 的细胞是分开的。与那些高表达 ESA 的人群相比，以上 12%的人群中 CD24 和 CD44 的表达则更加丰富。(B) 通过免疫复合小鼠体内注射 NOD/SCID，可以得到 200 个富含 CD24 低表达和 CD44 高表达的 ESA 细胞，这些细胞可能形成一个恶性肿瘤。而数量高达 20 000 个低表达 CD24 和高表达 CD44 的大群体细胞却很难形成恶性肿瘤。右上图显示了通过表皮组织培养所看到的部分正常皮肤和皮下肌肉壁的形态。右下图显示了部分肿瘤组织形态。(From M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983-3988, 2003.)

11.15)。

综上所述，这些实验表明乳腺和脑肿瘤，甚至很多其他器官的实体瘤和正常上皮组织的构成很相似。在正常上皮组织中，相对少量具有自我更新能力的干细胞就可以产生数量巨大的维持有限增殖能力的子代细胞。在这里所列出的实验（图 11.13 和图 11.14）中，具有成瘤性的小群体细胞在细胞表面表达一些特定的抗原标志，这些抗原在大群体细胞中并不表达，表明两种细胞处于不同的分化阶段。

在 8.11 节中，我们提到正常组织中的干细胞通常是低分化的，而它们的非干细胞子代通常进入更高的分化阶段。另外，干细胞似乎展现了无限的增殖能力，且由于它们的部分子代细胞仍然是干细胞，人们认为干细胞具有“自我更新”的能力。相反，高分化的子代干细胞通常进入有丝分裂后期并无法再重新回到活化的生长分裂周期中（图 11.16）。

我们有理由相信在肿瘤组织中存在相似的细胞组织形式，但是我们还没有确实的证

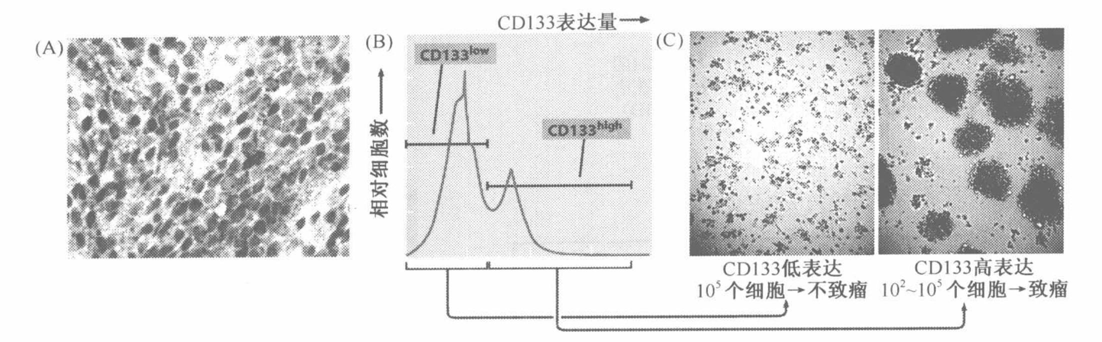


图 11.15　脑肿瘤干细胞增生　脑肿瘤干细胞通过表达一种神经细胞表面干细胞抗原 CD133 而被检测到。(A) 免疫组织化学染色显示高表达 CD133（红褐色）的人成神经管细胞瘤（一种小脑细胞瘤）散在分布于其他低表达 CD133 的肿瘤细胞中。细胞核呈蓝色。(B) 荧光激活细胞分类术（图 11.13）显示高表达或低表达 CD133 的人成神经管细胞瘤（表达水平随着横坐标的右移而增加）。纵坐标显示的是较低水平表达 CD133（左侧顶峰）的肿瘤细胞数量，占总数的 80%～85%，而高水平表达 CD133（右侧顶峰）的肿瘤细胞数量则较少（图中横坐标所显示的染色强度经过了对数处理）。(C) 悬浮培养的低表达 CD133 的细胞显示出有限的增殖能力（左侧），10^5 个这样的细胞不能导致宿主小鼠成瘤。相反，右侧顶峰所显示的高表达 CD133 的细胞则形成了大量的克隆，仅需要注射 10^2 个高表达 CD133 的细胞就能导致免疫妥协宿主小鼠体内肿瘤的产生（图中没有显示）。(From S. K. Singh, I. D. Clarke. M. Terasaki et al. , Cancer Res. 63:5821-5828, 2003.)

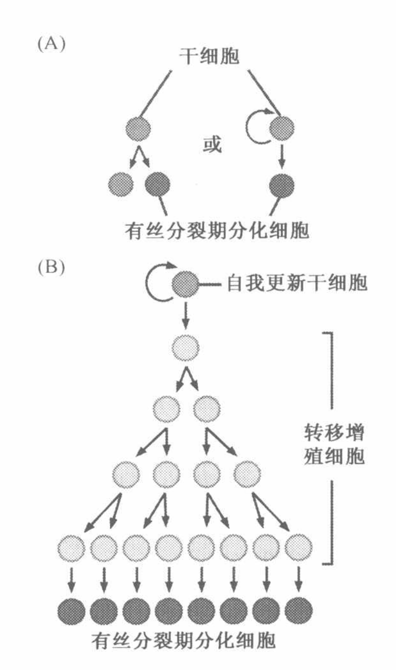


图 11.16　干细胞与其后代　(A) 简单的干细胞组织学行为包括干细胞及其子代细胞的不对称分裂（蓝）和其他一些子代细胞分裂能力的丧失，并开始分化（红）。以上两幅图分别展示了这两种组织学行为。(B) 在其他组织中，存在着更为复杂的机制。例如，图 A，某一个干细胞分裂形成子代干细胞，然而其他的细胞则形成"转移增殖细胞"，这些细胞最终进入某一分化途径而分化，但并不是终末分化。在子代细胞完全进入一个完整的分化阶段之前，这些细胞的子代细胞都进行着一系列的对称分裂（红）。

据证明这一假说。此外，大群体中的肿瘤细胞行为像很多正常组织中存在的**瞬间扩增细胞**，或者称为**祖细胞**（见图 11.16），代表了干细胞和完全分化的细胞之间的中间体（信息栏 11.5）。

信息栏 11.5　转移增殖细胞可以使少量的干细胞增殖形成数量庞大的子代分化细胞　维持一个连续更新的组织首先需要最新形成的子代干细胞保留其干细胞特性，而其他子代细胞迅速进入分化状态和有丝分裂后期，从而形成不具有分裂能力的细胞（图 11.6A）。事实上，在大多数组织中，干细胞形成的机制更为复杂（图 11.16B）。部分子代细胞保留了父代细胞原有的特性，而其他的子代干细胞则形成了一大群的分化细胞。这第二类子代细胞在其进入分化阶段和有丝分裂后期之前，能迅速分裂并在短期内指数扩增形成大量的转移增殖细胞。结果，这些单一的子代细胞能够产生几十个具有分化能力的子代后裔。这就意味着：①干细胞通过分裂形成大量具有分化特性的子代细胞；②干细胞的分裂是由于分化细胞的丢失或被取代；③大多数组织中细胞的分裂可能是通过转移增殖细胞的指数扩增完成的。

这些不同实验的结果使我们重新思考多步骤癌变发生的机制。在一个校正的理论中，新的克隆群体的祖先是小群体中的肿瘤细胞——成瘤性的肿瘤干细胞，而不是大群体中的大多数细胞。这意味着肿瘤干细胞群体的突变（图 11.17）可以传递到子代细胞，而非成瘤性的大多数细胞由于其增殖能力有限而不能将突变（数目更加巨大）传递到子代细胞。和多步骤癌变相关的遗传变异可能仅发生于数目相对较少的肿瘤细胞亚群——小群体肿瘤干细胞。

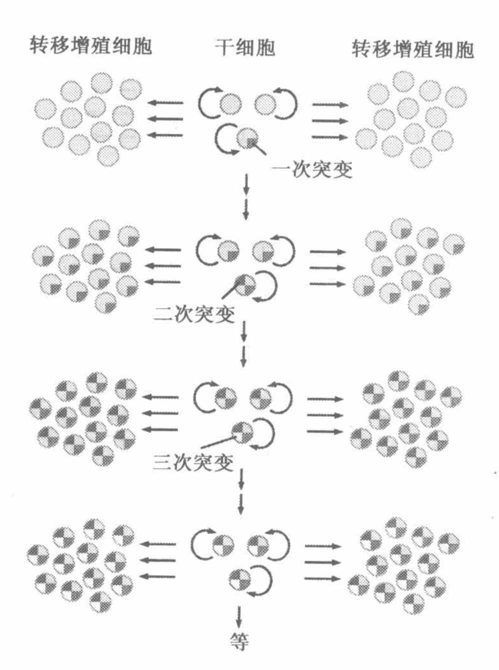


图 11.17　肿瘤干细胞和克隆演变
肿瘤干细胞的存在对于解释肿瘤进展和连续性克隆的发生具有重要的生物学意义。前面我们提到，低分化细胞（肿瘤干细胞）可以分化形成转移增殖细胞，而转移增殖细胞却不能分化形成肿瘤干细胞。除此之外，肿瘤干细胞代表了少部分肿瘤组织中的新生细胞，而转移增殖细胞则代表了大多数的肿瘤新生细胞。因此，如果肿瘤干细胞基因组发生突变，那么其子代干细胞基因组也随之发生基因突变，最终导致新的克隆演进。

（这一行为类似于多细胞生物的种系突变和体细胞突变。从原则上讲，种系突变可以传递到随后几代的数目不限的生殖细胞和体细胞中，而体细胞突变则不能，这是因为体细胞只可以产生有限子代的细胞且当有机体死亡的时候所有的这些细胞都消失了。基于这个类比，肿瘤干细胞就是肿瘤的“种系”）。

这个经过修订的理论可以使我们对驱动肿瘤进展的突变机制有新的认识。在一些肿瘤形成的过程中（如图 11.14 分析的乳腺癌），驱动克隆演变的突变必须发生在数以万计的细胞而不是数百万计的细胞群体中，因而驱动克隆演变所需的突变率（每次分裂发生的突变数目）比我们以前想象的要大得多。然而，可以预测在肿瘤干细胞比例更大的

其他肿瘤中（图 11.15），目标突变群体的大小要大得多，从而使肿瘤进展仅需较低的突变率。

11.7 单一的克隆演变并不能反映肿瘤进展的真实性

到目前为止，我们提出了克隆演变的两种框架（图 11.12 和图 11.17），这两个框架都认为肿瘤实体中参与特定克隆增殖的所有细胞在遗传上是同质的且肿瘤形成是一系列线性化克隆增殖的结果。根据这两个框架，如果我们研究癌前或癌细胞团中的细胞，我们将发现一个占优势的单一、遗传同质的细胞克隆，因为这个克隆会过度生长并最终取代先前的克隆（注意：克隆群体中的干细胞和过度放大细胞在遗传上是同质的，仅在表型上有差异，这是由于它们不同的基因表达水平）。

然而，我们必须考虑另一个因素，它使得肿瘤进展的实际过程更加复杂：随着肿瘤进展，肿瘤基因组变得越来越不稳定，每一代细胞获得突变的速率不断上升。遗传改变和其导致的遗传多样性很快超过了达尔文选择（不适应的亚克隆将被清除）进行的速度。因此，实际的肿瘤进展并非是一个线性的克隆演变过程，它们看起来更像图 11.18 展示的高度分支的框架，即一个肿瘤细胞团中存在多个遗传异质的亚克隆。

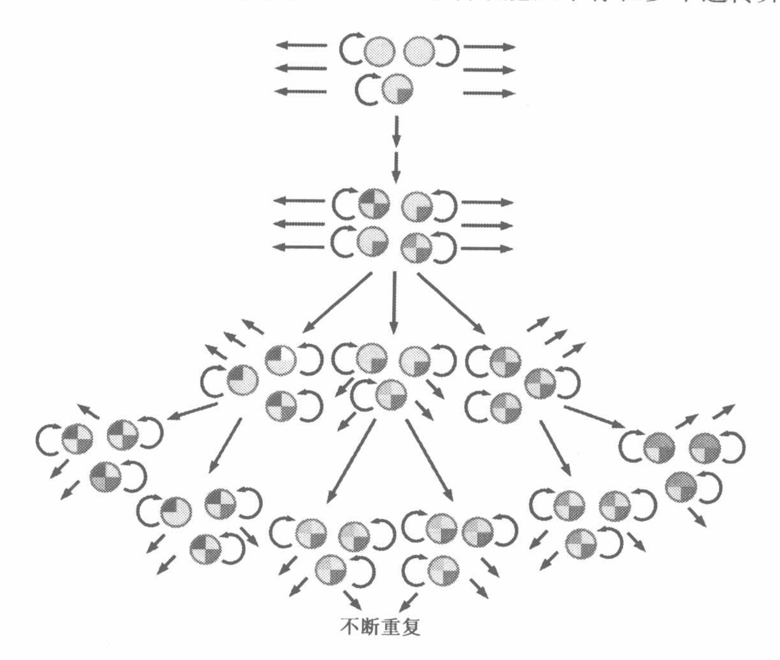
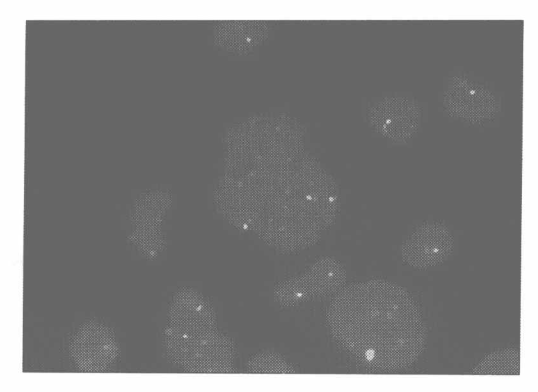


图 11.18 克隆多样性导致高突变率 随着肿瘤的进展，肿瘤细胞基因组逐渐变得不稳定。一旦基因组不稳定性增加，依据达尔文选择性消除理论，新的等位基因发生突变的频率也随之增加。结果，肿瘤组织内部形成具有不同遗传特性的部分。此图只描述了肿瘤干细胞的数量，箭头标记显示的大量的转移增殖细胞没有显示出来。

肿瘤细胞团遗传多样性的证据可以通过检测原发肿瘤实体中某个感兴趣基因的表达状态间接获得。图 11.19 是这种多样性的一个典型（且极端）的例子。这个例子采用 FISH 技术研究人类乳腺癌个体细胞 11 号染色体和 17 号染色体的拷贝数。很明显，在这个单一的肿瘤细胞团中，不同细胞具有不同染色体拷贝数。这种变异暗示所分析的肿瘤细胞基因组具有很大的可塑性，并且它们携带的 *CCND1* 基因的拷贝数也处于一个动态变化的过程，这种变化是随机的，并且其发生速率远超过达尔文选择能消除不适应的变异体的能力。

图 11.19 肿瘤细胞群的遗传多样性 在高度恶性的肿瘤组织中，细胞染色体的数量各不相同，这反映了肿瘤细胞遗传异质性的特点。在此图中，通过荧光原位杂交技术显示了非小细胞癌细胞中第 11 号染色体和第 17 号染色体拷贝数量。通过荧光原位杂交，可以看到肿瘤细胞中大量高倍体核型出现。（Courtesy of M. Fiegl.）



以上分析仅仅揭示了处于恶性生长阶段的肿瘤细胞所累积的遗传多样性的一小部分。通过对 58 例肉瘤基因组随机选择的 DNA 片段的测序分析，我们对广泛的遗传多样性进行了更加系统化的分析［每个 DNA 片段的分析依赖于聚合酶链反应（PCR），PCR 可以对选择片段进行选择性扩增，以用于进一步的测序］。从所分析的少量 DNA 片段推断，研究人员估计在这 58 个肉瘤中每个散发肿瘤至少存在 10^4 处序列改变，其中包括种类繁多的单核苷酸改变。令人惊讶的是，在 11 个散发腺瘤中也发现了数目相当的序列改变。后来的这一发现提示在多步骤癌变早期已经出现了广泛的细胞基因组不稳定和遗传多样性。

使用比较基因组杂交技术（CGH，图 11.20），研究人员揭示了遗传不稳定性的更深的层面。CGH 用于测量肿瘤细胞中各种染色体 DNA 片段拷贝数的增加与减少，可以产生大量的遗传学数据（图 11.21）。这些变异导致了一些关键的癌基因和抑癌基因的拷贝数发生改变，最终影响该肿瘤细胞亚克隆的增殖。染色体片段拷贝数的改变次数远高于肿瘤进展中克隆增殖的次数，这再次表明单个肿瘤细胞团中广泛存在遗传多样性。

累积的遗传异质性的后果可能在两个水平上体现出来。在一个特定的肿瘤细胞团

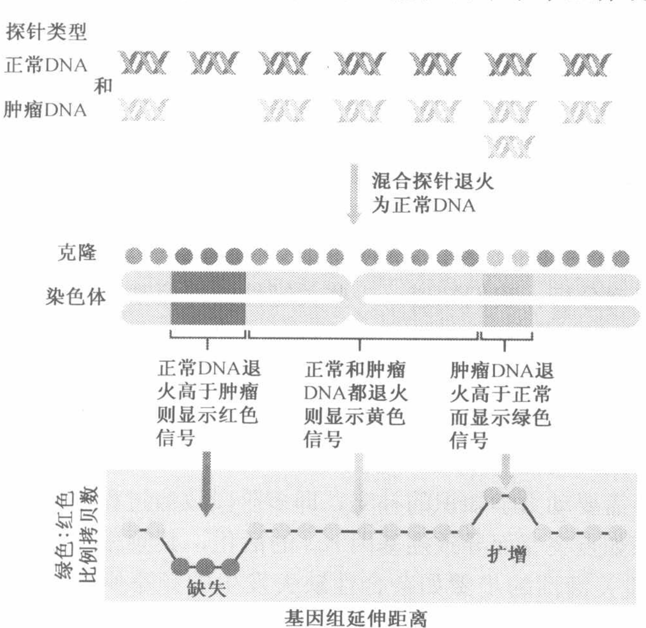


图 11.20 比较基因组杂交（CGH） CGH 技术能够帮助我们检测肿瘤细胞基因组中的拷贝数量，从而可以比较肿瘤细胞基因组中存在的核型比正常细胞中二倍体核型的数目多还是少。如图所示，将正常 DNA（红色）和肿瘤细胞 DNA（绿色）中的片段分别标记不同的染料，然后分别与正常细胞基因组中确定的染色体区域进行杂交。染色体片段中显示为红色的区域说明肿瘤 DNA 中与正常细胞 DNA 相对应的 DNA 片段发生了丢失。相反，那些标记为绿色片段表示肿瘤细胞基因组 DNA 中比正常细胞 DNA 多出的片段。而肿瘤细胞和正常细胞中 DNA 片段拷贝数量没有发生变化的区域显示为黄色。（Courtesy of J. W. Gray.）

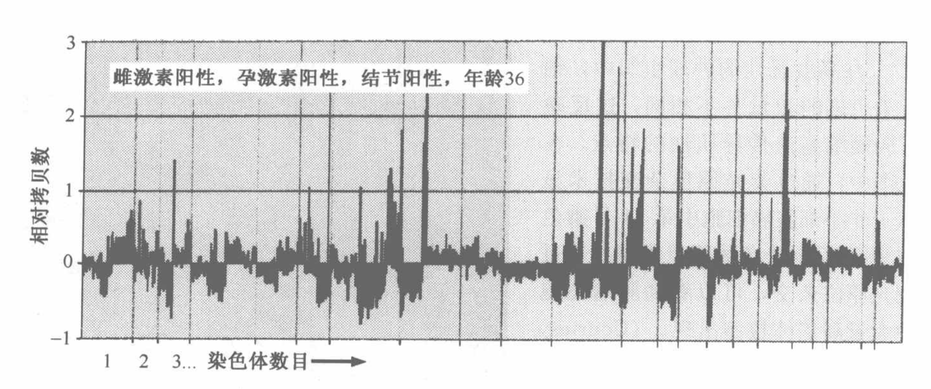


图 11.21 CGH 分析乳腺癌细胞基因组 显示了利用 CGH 技术分析 ER 阳性、PR 阳性、淋巴结转移阳性的 4 期人类乳腺癌细胞基因组 DNA。将人类所有的 22 对常染色体作为探针，从 1 号染色体（左）到 22 号染色体（右）套入垂直线表示的区域。与正常拷贝数量相比，反映待测片段扩增或缺失的程度。正常拷贝以 0 表示，其上方代表拷贝数量增加，下方代表拷贝数量减少。例如，我们可以发现肿瘤细胞中第 8 号染色体的某一片段比正常细胞中的拷贝数量高出了 2 个对数值。这个分析不可能解决这样一个问题，即是这些拷贝数量的变化还是其他的一些能够反映染色体不稳定性的拷贝数量改变在肿瘤进展过程中起着决定性的作用？以上这些分析显示了肿瘤组织中基因组的不稳定性和由此产生的遗传多样性。(Courtesy of J. W. Gray.)

中，不同的亚克隆携带不同的遗传改变（图 11.18）。这种异质性同样影响着具有相同类型肿瘤的不同患者之间的比较。这些肿瘤的基因型（如 20 个不同患者处于相同组织病理期的结肠癌）很可能彼此存在着非常大的差异。

11.8 肿瘤进展模式与达尔文学说的关系

在图 11.12、图 11.17 和图 11.18 中描述的肿瘤进展模式基本符合达尔文学说，但这仅只是一个理论上的构想。这一观点在学术上是成立的，但是缺少具体的实验证据。首先，肿瘤进展的达尔文模式需要得到遗传学和生物进化学说的支持。然而，对处于不同时期的肿瘤进行细胞基因组序列分析并不能反映出克隆演进过程中关键的遗传学改变（11.7 节）。肿瘤组织基因组中累积的基因变异远超过了克隆演进的数量，从而促进了肿瘤的发生与发展。

另一个存在的问题也阻碍了序列分析：我们知道，一些关键性的抑癌基因的失活通常是由于后天渐成的甲基化而产生的基因沉默造成的。通过这种方式产生的基因功能性失活一般发生在野生型 DNA 序列的等位基因上，它们的沉默是通过分析启动子甲基化状态和屏蔽肿瘤细胞转录本所决定的。**功能基因组学**也很难被用于区分基因的沉默是正常程序性分化的结果还是甲基化产生的病理性结果。

肿瘤进展的达尔文模式同样还需要动力学知识的补充，即多阶段致瘤过程中的每一步需要多长时间？其中的一些步骤如点突变而导致癌基因 *ras* 的活化，其频率一般为每代细胞从 10^{-7}～10^{-6}，而其他一些关键性的步骤如杂合性缺失发生的频率则更高，一般每代细胞为 100～1000。然而我们仍然不知道这些关键性的事件在每代细胞中发生的

频率，包括启动子甲基化、基因扩增、基因缺失和全染色体丢失。因此，可以看出肿瘤进展是如此迅速而且没有限速步骤。

肿瘤进展的某些过程可能受到细胞内诱变环境因素或染色体不稳定性的影响，只发生在一个很短的窗口期（10.11 节）。前面已经讲述了，肿瘤细胞基因组通常因为一个或另一个 DNA 修复机制的破坏而更加易变。

除非一些极少数的情况（信息栏 11.6），一般很难通过动力学对肿瘤进展过程中的每一步来进行检测。总而言之，通过以上多方面的考虑，我们仍然很难准确地理解单一的人类肿瘤是如何产生的。

信息栏 11.6 肺癌流行病学研究为多阶段致瘤假说最后的一步提供了线索 肿瘤发生发展的单一步骤很难通过动力学进行检测。然而，对于肺癌流行病学研究的一个特殊方面为我们提供了线索。那些长期吸烟者停止吸烟后，其肺癌的发病率并没有发生明显的变化。这提示肺癌在发生发展过程中除了最后一步以外，其他所有的步骤在停止吸烟之前就已经发生了，即最后的一步并不是由吸烟直接引起的。一旦这最后的限速步骤发生后，临床上可见的占位性病变就迅速地产生了，然而这一最终步骤的生物学和遗传学规律仍然有待发掘。

11.9 正常细胞具有抵御单基因突变造成细胞转化的能力

如前所述，肿瘤发生的关键步骤具有复杂性，因此我们不能仅仅依靠所观察到的单一升高现象就将其认定为致癌因素。在肿瘤发生的进程中更多决定性的因素需要被了解。这些致癌因素的详细机制需要在实验室中的得到验证，尤其是要引入有明确定义的遗传改变进入正常的细胞，给出精确的和具有前瞻性的解释，哪些特殊的基因型发生改变才能导致肿瘤细胞表型发生改变。

这一研究策略源自 Temin 的实验（3.2 节），其实验的思路是将鸡和哺乳动物的细胞暴露于一系列病毒癌基因，并观察其增殖。后来，类似的实验利用 DNA 转染技术导入一系列癌基因于培养细胞（4.2 节）。所有这些实验的变异细胞形态学表型的转化都在培养皿中成功地被精确测定。其他的实验还有停泊依赖性生长实验和在合适的动物宿主上形成肿瘤的能力为遗传修饰细胞的转化也提供了更多的证据。

其中一些实验似乎说明了遗传调控哺乳动物细胞变异的规则其实很简单。例如，构建一个突变体，通过将一个有活性的膀胱癌原癌基因 H-*ras* 导入正常的 NIH-3T3 成纤维细胞从而获得含有突变的 *ras* 癌基因的转化细胞，并最终能在宿主小鼠形成肿瘤（见第 4 章）。

这种 *ras* 转化的 NIH-3T3 细胞的生物学特性决定了单基因转化细胞的能力是非常有限的。单基因变异的 *ras*（原癌基因的点突变）足以诱导正常细胞发生恶性转化。此外，这种变异是起源于 *ras* 原癌基因的点突变。这一点表明 *ras* 基因的点突变影响了 NIH-3T3 成纤维细胞本身的原癌基因 H-*ras*，从而使细胞发生恶性转化。这是采用单一途径，单一点突变使一个正常细胞转化为肿瘤细胞的实例。

我们知道以往的细胞遗传学观点是有误的。单基因突变，无论是怎样的形式，都无法单独起作用，使一个正常细胞转变成一个肿瘤细胞。可以根据一个计算来证实

这一点。随机地给出一个人类基因的点突变率和人体细胞的总数（大于 3×10^{13}），有人估计每天有数以千计的 *ras* 原癌基因的点突变发生在全身。而 *ras* 原癌基因的点突变的全身负荷量可能超过百万，然而，人体并没有每天都有肿瘤产生。

这里有许多严重的错误观点，单纯依赖统计学和转染实验估计不到转化过程中的遗传学复杂程度。我们通常考虑在自然的状态下，特别是用于转化实验的细胞来探索问题并设计实验。例如，用于细胞转化实验的 NIH-3T3 细胞，其实也并非安全正常，自建立细胞系以来，一定数量的该细胞在适当的培养基上进行培养后可以进入一种不规则的增殖状态（见第 10 章）。这就提示，这些细胞在一定程度上经历了遗传或表观遗传的变异后，能够在培养基中呈现永生化生长。

早在 20 世纪 80 年代，研究者利用小鼠、大鼠或仓鼠的胚胎，将其从新鲜的活体组织中分离并在体外培养一段很短的时间，然后将 *ras* 癌基因导入正常的细胞，经过数月的培养后得到了永生化。这些细胞称为**原代细胞**，与经历了遗传或表观遗传变异的 NIH 3T3 细胞明显不同。

用大鼠、仓鼠胚胎原代细胞和 NIH 3T3 细胞得到的实验结果完全不一样，原代细胞对 *ras* 的转染不敏感，左边的阴性对照可以证明的确转染成功了，而且能够表达 ras 蛋白，但是细胞没有发生转化，这就提供了第一个证据，改造了的啮齿动物细胞通过培养，有的获得了永生化，而且对转染 *ras* 有应答。

但是，进一步观察表明，永生化细胞也并非正常细胞，即使存在许多正常细胞的特性，如接触性抑制和停泊依赖性。但是因为它们不正常的状态赋予它们能对 *ras* 的转染产生易感性，我们必须考虑它们早在转染癌基因之前已经发生了某种类型的基因突变。

非常清楚的一点是选择压力使在体外具有永生化特性的细胞和在活组织中的细胞存在着显著的差异。但是，二者的生物学特性和潜在的突变基因有可能是相似的。事实上，我们争论的焦点在于上一章提到的相同的调节通路（被 p53 和 pRb 蛋白调节的），这些在细胞无限增殖的过程中发生了改变，这种现象也同样出现在多数人类肿瘤细胞的基因组中。

原代细胞实验已经开展将 *ras* 癌基因导入大肠癌上皮细胞。有活性时，转染了 *ras* 的细胞只是发展为增生的细胞，只是数量上有变化，除此之外，基本上正常（图 11.22A）。

自然状态下的实验也支持单一突变不足以使肿瘤发生。例如，许多个体天生携带有 Kit 生长因子受体基因的种系突变，这种突变导致基因结构性的变异，配基不依赖的 Kit 生长因子受体是一种有功能的癌蛋白，这些个体具有患胃肠道间质瘤的高危因素。但是这种肿瘤在出生后的数十年后才被发现，尽管结构性变异的 Kit 癌蛋白自他们出生以来就携带。

同样的，许多个体被证明带有 H-*ras* 等位基因种系，一般在数十年之后才发生，许多早期的儿童非白血性白血病双胞胎也提供了单基因突变无法发展为肿瘤的证据（信息栏 11.7）。总之，种种的证据表明，一个细胞变成肿瘤细胞是要经历复杂的改变才能实现的。

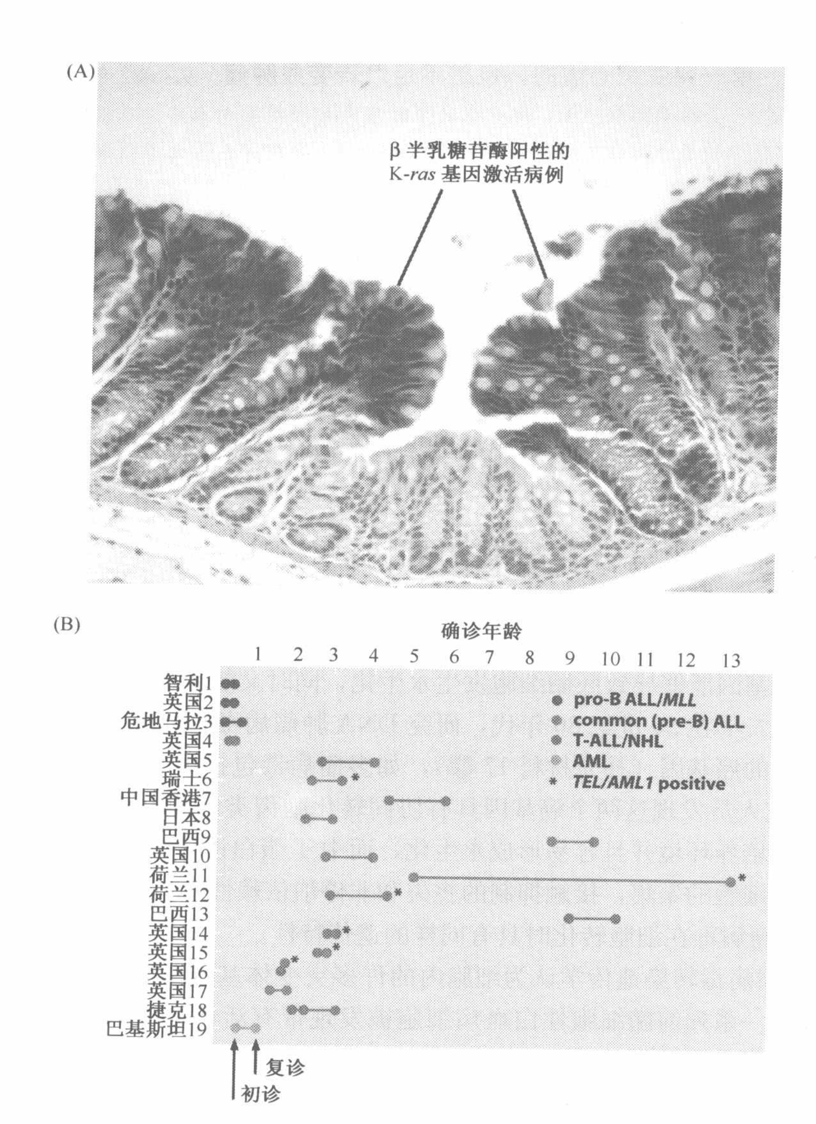


图 11.22　单基因遗传病和肿瘤启动：实验与天然疫病模型　(A) 通过对小鼠种系的改造，获得新的结肠上皮细胞，其中包括K-*ras*癌基因和β半乳糖苷酶基因的突变。这里，我们可以看到K-*ras*癌基因和β半乳糖苷酶基因发生突变的结肠上皮细胞可以导致局限性细胞增生。提示我们，*ras*癌基因还不足以使细胞转化为具有致瘤性的恶性细胞。(B) 在全世界范围内，我们收集了大量患相同类型的白血病的单卵双生子的资料。证明了白血病往往具有相同的染色体标记和基因突变，提示我们这些细胞由相同的初始细胞克隆诱导而来。事实上，很多这样的白血病发生在个体出生后的不同时期，证明了这些初始的体细胞突变发生在子宫内。右上角的颜色标签显示了通过不同的基因标记的白血病亚型。(A，courtesy of K. M. Haigis and T. Jacks；B，from M. G. Greaves，A. T. Maia，J. L. Wiemels and A. M. Ford，Blood 102:2321-2333，2003.)

信息栏 11.7 单一突变是必需的，但是不足以转变成肿瘤 从 1882 年开始，大量的医学研究报道描述了 70 多组**单卵双生子**，他们在幼年时期患相同类型白血病。在过去的 20 年时间里，对 19 对类似的双胞胎患者进行了研究：①它们都来自同一受精卵；②大多数病例中，白细胞中染色体发生同样的易位。通过对这些染色体基因克隆和序列分析，证明了这些突变具有共同的起源。最早的染色体易位可能发生于每对双胞胎中的某一个个体。随后，突变的结果通过胎盘环境转移至另一个体（除白细胞以外的其他细胞在双胞胎中不发生突变，说明这种起始的突变发生于体细胞）。

除了白血病患者细胞发生突变具有共同特点以外，每个白血病患者 DNA 也具有其各自的异常变化，这说明出生后肿瘤发生发展过程中发生了进一步的基因突变。如图 11.22B 所示，双胞胎个体在不同的生活环境下同样发生白血病。以上这些研究阐述了一个简单的遗传学规律，当白血病的产生条件足够充分后，其他一些限速时间必然会在肿瘤形成之前参与到肿瘤进展的过程中来。

11.10 细胞转化需要变异基因的协同作用

正常啮齿类动物细胞对 *ras* 诱导的转化产生的抵抗提出了一个有趣的问题：是否存在其他一些癌基因能够导致胚胎细胞发生永生化，同时又能使这些细胞对于 *ras* 诱导的转化更加敏感？早在 20 世纪 80 年代，研究 DNA 肿瘤病毒时发现基因组中有许多肿瘤病毒带有突变的癌基因（补充材料 17），如多瘤病毒包括中 *T* 基因和大 *T* 基因；在 1982 年，研究人员发现这两个癌基因具有协同转化啮齿类细胞的作用。大 T 癌蛋白有助于细胞适应培养环境并且容易形成永生化，而中 T 蛋白诱导出了许多与 *ras* 癌基因有关表现型，如细胞的聚集，接触抑制的丧失和非停泊依赖性生长。后来，又发现许多同样的 DNA 肿瘤病毒在细胞转化时具有同样的遗传特性。

DNA 肿瘤病毒转染遗传学认为细胞内的许多突变体基因共同起作用产生细胞的变异，事实上，一系列前髓细胞性白血病细胞被发现带有活性的 N-*ras* 和 *myc* 两个癌基因，这就说明两个癌基因共同决定了前髓细胞性白血病的恶性表型。这个事实迅速被一个实验证实：一个 *myc* 基因与一个 H-*ras* 共同转染入大鼠的胚胎成纤维细胞产生了恶性转化（图 11.23），重要的是，单独一个癌基因不能使细胞发生转化。

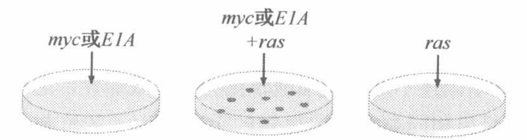


图 11.23 癌基因共同作用 通过磷酸钙 DNA 转染鼠胚成纤维细胞或地鼠肾细胞，在癌基因的协调作用下使其发生恶性转化。在这些细胞中（左图）导入 *myc* 基因或腺病毒基因 *E1A* 同样不能产生转化体，尽管导入的这些癌基因能够长期并且稳定的存在于早期传代细胞中。同样，通过转染（右图）将 H-*ras* 基因引入这些细胞也不能形成转化细胞，尽管在半固体培养基中形成大量的锚定依赖性细胞集落。然而，在细胞中同时引入 *ras*、*myc* 或 *ras*、*E1A* 基因则能形成转化细胞，将这些转化细胞接种到同基因型或免疫缺陷型宿主中可以诱导肿瘤的产生。

这一结果可以得出许多有趣的结论。很清楚，这两个癌基因通过不同的方式影响了细胞表型，而且它们相互作用而使细胞发生转化，两个基因的协调作用可以导致某种细胞表型的变化。就如 *ras* 可以诱导停泊非依赖性生长，相差显微镜下可以观察到圆形的有折射的细胞表型，而丧失了接触性抑制，*myc* 使得细胞具有永生，并且可以逃避生长因子的调控。同样的结果出现在利用人腺病毒 *E1A* 癌基因和 *ras* 协同作用转化细胞的实验中。

随后，有许多体内和体外的实验证明了一些成对的癌基因可以相互作用，产生细胞表型的变化，表 11.1 中 *ras* 癌基因和 SV40 相互作用，多瘤大 *T* 癌基因 、*src*、*raf* 和突变的 *p53* 共同作用共同引起细胞转化。

表 11.1　体内外癌基因共同作用的例子

ras 样癌基因[a]	*myc* 样癌基因[a]	靶细胞和器官
体外转化实验		
ras	*myc*	转染兔胚胎成纤维细胞
ras	*E1A*	转染兔肾细胞
ras	SV40 大 *T*	转染 REF
Notch-1	*E1A*	转染兔肾细胞
体内致瘤实验		
中 *T*	大 *T*	多病毒诱导的鼠类肿瘤
mil（同 raf）	*myc*	MH2 鸟类白血病病毒诱导的鸡类肿瘤
erbB	*erbA*	鸟类胚胎成纤维细胞病毒诱导的鸡类肿瘤
piml	*myc*	鼠白血病病毒诱导的肿瘤
abl	*myc*	鼠白血病病毒诱导的肿瘤
Notch-1/2	*myc*	转基因鼠胸腺瘤
bcl-2	*myc*	转基因鼠滤泡淋巴瘤

a“*ras* 样”和“*myc* 样”代表基因功能的分类，而不是信号通路中的编码基因。“*ras* 样”癌基因通常编码细胞质级联信号组分，而“*myc* 样”则编码核蛋白。

在许多情况下，相互作用的两个基因按照功能被分成两种：一种有 *ras* 特性，另一种有 *myc* 特性。事实上并不是所有的 *ras* 样或 *myc* 样就引起相同的变化，有趣的是，*ras* 样癌基因编码大多数的细胞质癌蛋白，而 *myc* 样倾向于编码细胞核癌蛋白（表 11.2）。我们现在知道了 *ras* 样癌基因参与组成细胞质中的丝裂原级联信号反应，而 *myc* 样扰乱了许多细胞周期调控机制，这些过程发生在细胞核（第 8 章）。

表 11.2　癌基因协同作用的生理学机制

癌基因对	细胞类型	作用机制
ras＋SV40 大 T 细胞	兔 Schwann 细胞	ras：增殖以及增殖阻滞 大 T 细胞：防止增殖阻滞并诱导促有丝分裂元件
ras＋E1A	鼠胚胎成纤维细胞	ras：增殖和衰老 E1A：预防衰老
erbB＋erbA	鸡红细胞	erbB：诱导 GF 依赖性增殖 erbA：阻止分化

续表

癌基因对	细胞类型	作用机制
TGF-α+myc	鼠乳腺上皮细胞	TGF-α：诱导增殖和阻止凋亡 myc：诱导增殖和促凋亡
v-sea+v-ski	鸟类红细胞	v-sea：诱导增殖 v-ski：阻止分化
bcl-2+myc	兔红细胞	bcl-2：阻止凋亡 myc：诱导增殖和促凋亡
ras+myc	兔红细胞	ras：诱导锚定依赖 myc：诱导永生化
raf+myc	鸡巨噬细胞	raf：诱导生长因子分泌 myc：诱导增殖
src+myc	兔肾上腺皮质细胞	src：诱导锚定和血清依赖 myc：延长增殖

这些癌基因之间相互作用的实验为体内的多级转化提供了天然的体外模型，同时也引出了一个原理，即遗传变异是肿瘤产生的原因和条件。一个遗传改变导致了一种或者更多的细胞表型的变化，从而使得细胞发生恶性转化（表 11.2）。这种单一的作用看上去是来自每一个癌基因都干扰着细胞内的某个特定的信号通路，更多的是这些实验可以得到这样一个结论，细胞增殖和细胞的生存是受一系列不同的细胞信号通路调节和控制的，肿瘤的发生就是其中某条细胞信号通路破坏的结果。

近年来，我们注意到了癌基因在细胞表现型上具有多效性，每一个基因可以导致很多细胞表型的改变。依据这一观点，我们必须接受一个多能的癌基因表面上似乎都不能通过自身活化而使一个正常细胞发生恶性转化而进入致瘤状态。至于细胞癌基因，我们可以看出明显的进化原理，正如前面几章所提到的：哺乳动物细胞无法抵御原癌基因在其染色体组中的突变事件，最后发展成肿瘤细胞。这样的一个原癌基因在单个细胞癌变过程中只是微小的作用，但是却在整个机体的变化过程中起很大的作用。这就有了另一个结论，细胞和组织必须在多重干扰下才能发生恶性转化。有趣的是，在特定的实验条件下，研究者可以通过改变单一基因而诱导细胞发生恶性转化（信息栏 11.8）。

信息栏 11.8　多步骤转化过程被简化　单个癌基因或遗传因素的改变，能导致变异细胞的产生，这在一系列实验中得到证实。例如，鸡胚成纤维细胞（CEF）通过 RSV（Rous sarcoma virus）进行体外感染，这单一的步骤就能使细胞致瘤，而在体内，其肿瘤的形成仅在一些创伤部位发生，包括当时肌肉注射 RSV 时留下的针孔痕迹。因此，在创伤修复过程中，成纤维细胞的改变悄然发生，看起来像是获得 RSV 的 *src* 基因的转化，最终形成肿瘤细胞。

在对大鼠胚胎成纤维细胞处理的实验中显示：经过 *ras* 转化形成的细胞在 Petri 培养皿中与其他细胞分离开来（说明其未被正常的或未转化的细胞包围）。这类细胞能形成克隆，以至增殖形成癌变细胞。甚至不需要类似 *myc* 的另一些癌基因共同作用就可产生。然而这类细胞被正常的邻近细胞包被（常可能发生在体内肿瘤进展的早期），导致其不能增殖形成癌变的焦点。通常，单步骤的转化实验有时能成功，这是因为人们未能明确有些抗肿瘤的机制，尤其在活体组织中。这在细胞或组织形成肿瘤，乃至演进过程中，需要额外的改变。

11.11 转基因鼠模型在研究癌基因相互作用和多阶段细胞转化中的作用

在肿瘤发病机制的动物模型中，多运用啮齿类动物来进行的研究，使其暴露于诱变剂和致癌物，诱导肿瘤发生。通过插入已知的突变基因或将活化的癌基因导入实验动物的生殖细胞中，随机的（有时称为随机化）产生突变的等位基因，并保证这些基因在一些组织中表达，从而导致肿瘤发生。致癌的等位基因必须限制在小鼠体内的少量组织中（若其在所有组织中都表达，包括那些正在发育的胚胎，那么胚胎将受损，甚至死亡，从而导致流产或终止妊娠）。

这项技术的早期模式是为了制造肿瘤易感性模型；**转基因**鼠包括 *ras* 或 *myc* 等致癌的等位基因插入到生殖细胞（图 11.24）。在一系列重要的实验中，*ras* 或 *myc* 癌基因的插入在鼠的乳腺瘤病毒（MMTV）载体的转录启动子下游，这种病毒是一种逆转录病毒，能在乳腺组织特异性表达。该病毒的启动子仅在乳腺中高表达，而在唾液腺中的表达较弱。

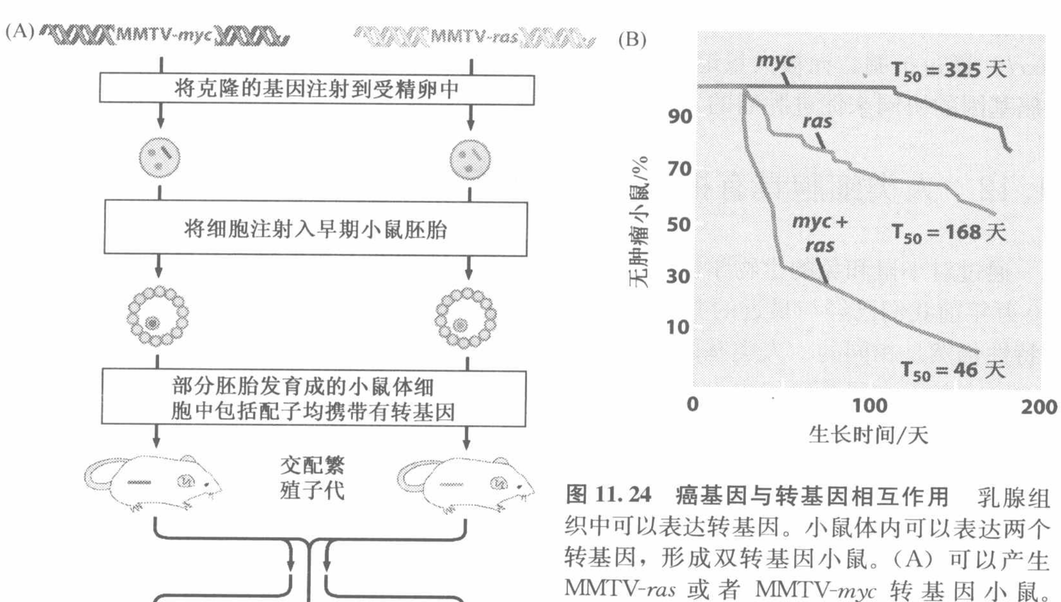


图 11.24 癌基因与转基因相互作用 乳腺组织中可以表达转基因。小鼠体内可以表达两个转基因，形成双转基因小鼠。(A) 可以产生 MMTV-*ras* 或者 MMTV-*myc* 转基因小鼠。(B) MMTV-*ras*或 MMTV-*myc* 转基因小鼠乳腺癌的发生率随之提高。除此之外，小鼠体内的双转基因对肿瘤发生发展的影响还不太明确。将无肿瘤小鼠（纵坐标）与生长时间（横坐标）进行比较，T_{50} 表示导致一半的小鼠发生肿瘤所需要的时间。(From E. Sinn, W. Muller, P. Pattengale et al., Cell 49:465-475, 1987.)

正如我们所预料的，小鼠生殖细胞中导入任何一个致瘤的转基因都能诱导其子代乳腺癌发生，而不会诱导唾液腺瘤的发生。无论是 *ras* 或 *myc* 癌基因，尽管它们不在这些转基因鼠的所有乳腺上皮细胞中表达，但仍占据绝大多数。这些乳腺显示了明显的形态

学改变（在 *myc* 或 *ras* 的转基因小鼠中）。甚至，仅仅在四周龄的小鼠中，就能观察到乳腺肿瘤的发生——在性成熟前期的一段时间尤为明显（图 11.24）。这最终能确定在活体组织的正常细胞中，单个癌基因的存在并不是依靠其自身，大量地转化到这个细胞而使之成为了肿瘤细胞，取而代之，在这些 *ras* 或 *myc* 癌基因促进乳腺细胞的癌变之前，乳腺肿瘤形成的动力学原因包含一个或多个随机事件的累积效应（图 11.22A）。

通过上述两种转基因鼠杂交所得到的携带有 MMTV-*ras* 和 MMTV-*myc* 的双重转基因鼠患肿瘤的概率较亲本更高，即单个基因的转基因鼠（图 11.24）。因此，导入两种癌基因能在体内相互作用而产生肿瘤，在体外的类似实验已在 11.10 节讲述过。

即使双重突变的癌基因在早期发育的乳腺细胞中大量表达，肿瘤也并不会迅速在新生小鼠体内产生。因此，这两种突变的癌基因的共同表达并不能完全转化鼠的乳腺上皮细胞（MEC），这清楚地说明这些细胞要经历额外的随机事件。在它们像成熟的肿瘤细胞一样，在增殖之前表面上看是一个体细胞的突变。另一观点，随机事件，来自于对小鼠细胞的分析，通过 *ras*+*myc* 设计的体外实验得知，这类细胞会因为突变或甲基化而导致 p53 抑癌基因失活。（见第 9 章）。

此前提及的转基因的协同作用时，我们进一步了解 *myc* 和 *bcl-2* 转基因的倍增协同作用能促进淋巴瘤的形成（见图 9.22）。在这些实例中，*bcl-2* 的作用（以及它的同族 *bcl-xl*）通过抗凋亡而被大量地诱导出来。这说明通过一系列细胞生理学机制的作用推动癌基因的协同来促进肿瘤的发生，这点请见表 11.2。

11.12　人类细胞具有抵抗永生化和转化的能力

通过对小鼠和兔的生物学研究，我们可以更好地理解人类生物学的各个方面。尽管 800 万年前我们已经与最近的共同祖先（啮齿类）相分离，但是大多数生理学和生物化学特性仍然是相同的。人类基因组与啮齿类基因组同样也十分相似：人类基因组中大约 20 000 个基因在鼠基因组中也都发现。这就是为什么永生化和转化等生物学进程在啮齿类和人类细胞中本质上相同的原因。

但是在生物学功能方面却存在着不同。经体外连续传代培养相对少量的次数，啮齿类细胞可以很容易地诱导其永生化。自发永生化的细胞也很常见，如前面所提到的 NIH3T3 细胞。相反，人类细胞则很少能通过连续传代培养的方法获得永生化（见第 10 章）。最终，体外培养的人类细胞停止生长并衰老，不会出现自发永生化的细胞。

通过实验室转化的细胞，我们可以比较细胞行为学的种属差异。早期的啮齿类动物细胞在体外形成转化细胞通常是由于某一对癌基因的导入，而这样的癌基因的导入却不能导致人类细胞癌变。事实上，转化的人类细胞也不能获得永生化，因此，衰老是一个必然的过程。

反复的细胞转化失败阻碍了研究者对一些基本的人类肿瘤生物学的研究：到底需要干扰多少条信号调控通路才能将正常细胞转化成肿瘤细胞呢？人类肿瘤细胞基因组序列的分析也不能解决这个问题。正如前面所讨论的（11.7 节），与其他致瘤因素相比，人类肿瘤保持着一种较多的遗传学改变状态是最重要的原因。这就要求研究者将实验室转化细胞作为解决此问题的方法之一。因此，必须知道到底有多少遗传学改变需要导入人类细胞才能将其转化。

综合研究结果表明，依据先前啮齿类细胞的培养经验，细胞一旦在培养过程中形成永生化，那么它们就能通过 *ras* 癌基因的作用发生转化。啮齿类和人类细胞端粒生物学特性完全不同（10.9 节），似乎可以解释为什么部分人类细胞很难发生永生化，因为它们对癌基因的导入存在着不同的应答机制。小鼠细胞内通常含有较长的末端着丝粒的染色体（大约有 40kb），并且能够表达容易被检测到的端粒酶活性。比较研究发现，人类细胞端粒更短，大多数类型的人类细胞缺乏明显的端粒酶活性。因此，导入 *hTERT* 基因有助于诱导人类细胞发生永生化。

事实上，导入 *hTERT* 基因（除了 SV40 大 *T* 基因，因为 SV40 的编码产物能导致抑癌基因 *pRb* 和 *p53* 的失活）确实能诱导人类细胞永生化（导入人类乳头瘤病毒 *E6* 和 *E7* 癌基因同样能成功诱导人类细胞永生化）。一旦通过以上这些改变如导入 *ras* 癌基因的成功诱导人类细胞永生化后，培养皿中的细胞即在形态学上开始发生转变。

然而，这些形态学上变化的人类细胞并没有完全发生转化，它们还不具有使免疫缺陷宿主小鼠致瘤的能力。这些细胞仍然需要另一个改变，即导入一种能编码 SV40 中 T 癌蛋白的基因。中 T 癌蛋白具有干扰蛋白质磷酸酶 2A（PP2A；补充材料 18◎）某一亚型的功能。

上述实验描述了由 5 种不同细胞所调节的通路，通过改变这些信号通路才能使免疫缺陷小鼠产生肿瘤（图 11.25）。这些改变包括：①由 Ras 调控的有丝分裂信号通路（第 6 章）；②由 pRb 调控的细胞周期检查点（第 8 章）；③由 p53 调控的损伤修复信号通路（第 9 章）；④由 hTERT 调控的端粒维护途径（第 10 章）；⑤由蛋白质磷酸酶 2A 调控的信号途径。

信号通路	Ras	pRb	p53	端粒	PP2A
参与信号调节的基因/因子	*ras*	*CDK4 + D1* *SV40 LT* *HPV E7*	*DN p53* *SV40 LT* *HPV E6*	*hTERT* *myc + SV40 LT*	*SV40 sT* sometimes: *myc* *Akt/PKB+Rac1* *PI3K* B56 shRNA

图 11.25 人类细胞转化过程的胞内途径 研究人员通过将各种克隆基因的组合导入细胞对人类细胞进行转化。一开始，他们发现编码 SV40 大 T 癌蛋白、hTERT 端粒酶和 SV40 中 T 癌蛋白的三个基因的组合足以使很多种类型的人类细胞发生恶变。这三个基因可以使以下 5 个不同的信号通路发生异常：①Ras 有丝分裂信号通路；②pRb 介导的细胞周期控制；③p53 通路；④端粒维持通路；⑤蛋白磷酸酶 2A（PP2A）通路。随后的研究表明其他基因的组合也能够诱发细胞恶性转化。例如，异位表达的 CDK 抑制剂抵抗的 CDK4 及周期素 D1 能够使 pRb 功能异常；负显性 *p53* 等位基因可以干扰 p53 正常功能；SV40 大 T 癌蛋白和 *myc* 的组合能够激活端粒酶；抑制 PP2A 亚单位 B56 合成的 shRNA 表达载体可以阻碍 PP2A 正常功能。现在仍然不清楚是否所有的人类细胞的恶性转化都需要这 5 个通路，以及是否散发的人类肿瘤都存在这 5 个通路的异常。

以上实验为我们解释人类细胞避免发生恶性转化提供了明确的证据。同时，也存在一些问题，体外转化的细胞是否能正确反映正常人组织细胞在体内改变并增殖形成肿瘤的过程？显然，其中 4 条途径（Ras、hTERT、pRb 和 p53）在人类肿瘤细胞中是常见

的。那么，第 5 条途径，即 PP2A 途径是否能导致人类肿瘤的产生？另外，其他一些没有经过实验室验证的遗传学改变也可能产生临床上能检测到的肿瘤。这些实验结果同时也给我们提出了有待解决的问题，以上这些遗传学和生物化学的理论是否在所有人类肿瘤中都具有代表性（信息栏 11.9）？

信息栏 11.9　人类恶性肿瘤的产生过程中是否相同的调控通路都发生了变异　广泛的人类正常细胞类型可以通过图 11.25 中所示的 5 条信号通路在实验室发生恶性转化。其中包括成纤维细胞、肾细胞、乳腺、前列腺、卵巢、肺组织上皮细胞和脑组织星行胶质细胞。这些转化所必需的相同的条件提示我们，由于成人机体正常细胞类型中存在的某种共同的生物化学通路的阻断，导致正常细胞成功的转化为恶性细胞（在各种类型的恶性肿瘤中，每条通路可能由于各种不同的遗传学和外源性机制发生阻断）。

然而，人类正常细胞发生转化前到底需要更多的还是更少的改变仍然不太明确。例如，某些儿童恶性肿瘤发生在生命的早期，因此很难想象这些肿瘤组织中的细胞具有足够的时间积累大量的突变。

以上证据提示我们，儿童恶性肿瘤可能是直接通过某些胚胎细胞转化而来，而这些胚胎细胞可能在其产生成人恶性肿瘤的癌前细胞之前就发生了转化（通过少量的改变）。这些胚胎细胞主要通过胚胎干细胞（ES）分化而来。研究发现，胚胎干细胞遗传起源均为野生型，当导入同源性宿主后产生致瘤性。确实如此，野生型胚胎干细胞具有致瘤性。可能是由于某些晚期胚胎细胞的需要，这些胚胎干细胞发生了一定数量的遗传学改变，这个改变的数量介于胚胎干细胞自身转化（0）和成人细胞实验室转化（5）所需要的遗传学改变数量之间。

人类细胞与小鼠细胞的生物学行为差异需要用一些生物学理论来解释。确实，我们已经讨论过了这一点（10.9 节）：小鼠细胞在其一生中需要经历 10^{11} 次有丝分裂过程，而人类细胞却要经历 10^{16} 次有丝分裂。为了应对每个细胞周期所存在的危险，人类的细胞和组织对细胞分化产生了更强的抑制。这种观点仍然有待验证和推广。例如，是否发生在大黄蜂和蓝鲸体内的肿瘤必须按照其身体重量来计算每个细胞经历有丝分裂的次数（图 11.26）（哺乳动物一生中可能会产生众多累积的有丝分裂变异，而通常大动物的存活时间是小动物的百倍）？

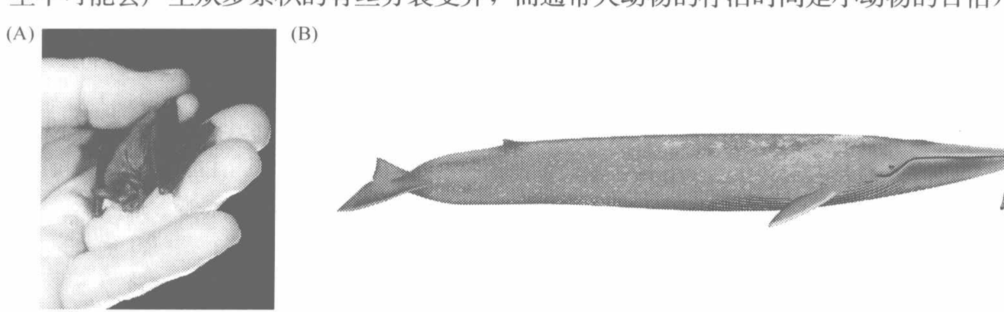


图 11.26　身体大小与细胞相关风险　虽然各种哺乳动物单个细胞大小相当，但是它们的体重及细胞数目差异巨大。因为每个细胞周期循环都会增加基因组改变的危险，所以物种之间肿瘤发生的风险可以有明显差别。（A）泰国的黄蜂蝙蝠据说是世界上最小的哺乳动物，发现于 1973 年；体重仅有 1.5g，翅膀长 15cm。（B）蓝鲸体重大约有 1.3×10^8g，寿命大约 80 年。黄蜂蝙蝠和蓝鲸体重（即细胞数目）8 个数量级的差别以及 1.5 个数量级的寿命差别意味着两者在一生中经历的细胞分裂数目相差 10^9 倍（由于黄蜂蝙蝠的代谢率是蓝鲸的 10^3 倍，而细胞基因组的变异主要来自氧代谢副产物，因而蓝鲸发生癌症的风险可能是黄蜂蝙蝠的 10^6 倍）。（A，courtesy of Merlin D. Tuttle，Bat Conservation International；B，courtesy of Uko Gorter.）

各种演示癌基因与小鼠和人类细胞作用的实验可以作为一个很好的解释人类机体多阶段致瘤的模型。因此，某一物种细胞中每个基因突变（或基因甲基化）都是由信号通路所控制的，直到所有关键性的通路受到干扰或抑制。一旦完成这些干扰或抑制，那么物种中的细胞则可能完全转化为具有极强增殖能力的肿瘤细胞（信息栏 11.10）。

信息栏 11.10　人类恶性肿瘤遗传学混淆了我们对肿瘤进展发生的理解　多阶段致瘤过程最基本的步骤提示我们，每个连续的致瘤步骤都包括另一个关键的细胞信号通路的阻断或紊乱。因此，人类恶性肿瘤细胞基因组中发现的每个基因突变（或甲基化）可以影响一条特定的信号通路，而且，晚期进展期肿瘤中突变基因的累积可以相互作用参与肿瘤的形成。事实上，一些明确的遗传学证据通常与以上观点相违背。

很多人类结肠癌基因组突变导致 PI3 激酶信号通路和 B-Raf 信号通路的激活，一旦这两种突变产生了明显的作用，那么其下游的 Ras 信号通路则被激活（第 6 章）。然而，很多其他类型的恶性肿瘤同样包含 PI3 激酶和 Ras 信号通路的激活，但是却不产生生物学效应；因此，这两种突变看上去在功能上是多余的，而不是互补的。

相反，相互作用的基因突变如那些作用于 *ras* 和 *p53* 的基因突变通常是相互排斥的。因此，在人类结肠癌中，一些 *ras* 基因发生突变，而其他的则发生 *p53* 基因突变，很少有这两种突变同时发生（与前面所描述的遗传学途径导致肿瘤发生的观点正好相反，见 11.3 节）。同样，在人类膀胱癌中，突变导致纤维细胞生长因子受体-3 活化的同时，很少发生 *p53* 基因突变。以上事实使我们很难去理解这些基因和其编码的蛋白质是如何作用的，我们只能说这些问题迟早会被得到修正。

显然，通过实验操作将人类细胞转化为肿瘤细胞并形成的局部原发性肿瘤很难具备足够的侵袭和转移能力。①通过延长肿瘤边界和侵犯邻近组织以及②远端种植转移。因此，首先我们需要诱导细胞产生致瘤性，然后分析其遗传学变化特点，这是我们将在第 14 章中讨论的问题。除此之外，这一“五步法”实验室转化人类细胞的方案帮助我们避开了一个重要的问题，也就是我们将在下一章节要讨论的：人类基因组可突变性一般较低，在人的一生中，组织细胞群体很难获得肿瘤发生发展所需要的所有遗传学特征。

11.13　非诱变剂在肿瘤进展中的重要作用

本章所提供的临床观察和实验结果为我们粗略地描述了肿瘤细胞产生过程中所发生的遗传和表观遗传学改变的现象，却没能揭示到底这些改变是如何在肿瘤进展过程中产生的。因此我们应回答这样一个问题，体内细胞是如何大量积累这些改变而形成肿瘤的。

我们这里将要描述的一个连续的遗传学改变为研究肿瘤进展提供了极大的帮助。诱变剂能够产生的大量的这种遗传学改变，从而提示肿瘤的进展很大程度上是因诱变剂的作用而产生。当然，我们需要依据表现遗传的原则对这一方案进行修改，特别是那些通过启动子甲基化而产生的肿瘤（至今，对于甲基化事件是通过外源性因子诱导还是通过其自发产生仍然不太明确）。

除了一些比较明确的诱变剂能导致肿瘤的发生（2.9 节），更多的证据表明非诱变剂也参与肿瘤的形成。一种重要的**非诱变剂**曾在 1940 年被用于诱导小鼠皮肤癌的产生。这种实验模型通常是将小鼠暴露于高致癌剂环境如苯芘、7,12-二甲苯并蒽或 3-甲基-胆蒽（3-MC；图 2.22）。例如，每日将小鼠皮肤表面涂抹 7,12-二甲苯并蒽可以诱导小鼠

皮肤癌的产生。

但是，其他的实验资料能更好地揭示皮肤癌产生的机制。单一的在小鼠皮肤表面涂抹7，12-二甲基苯并蒽之后，在同样区域使用另一种致癌试剂，如12-*O*-十四烷酰佛波-13-乙酸酯（TPA）（图11.27）一周，小鼠皮肤表面的肿瘤既会迅速增大；重复地在7，12-二甲基苯并蒽暴露区域涂抹TPA 4～8周可以导致小鼠皮肤乳头状瘤产生（图11.28A～C）。

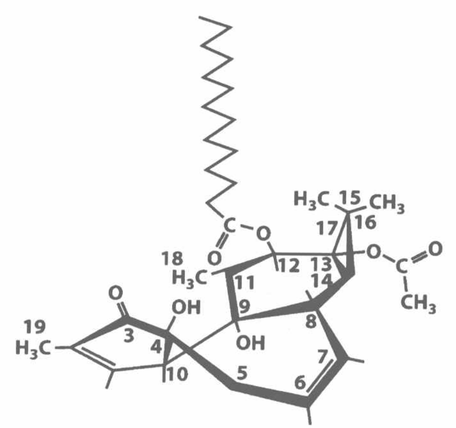


图11.27 TPA——重要的皮肤致癌物此图为12-*O*-十四烷酰佛波-13-乙酸酯（TPA）的立体结构，TPA又名佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯（PMA）。TPA从巴豆属植物中提取，其靶蛋白为蛋白激酶Cα（PKCα）。

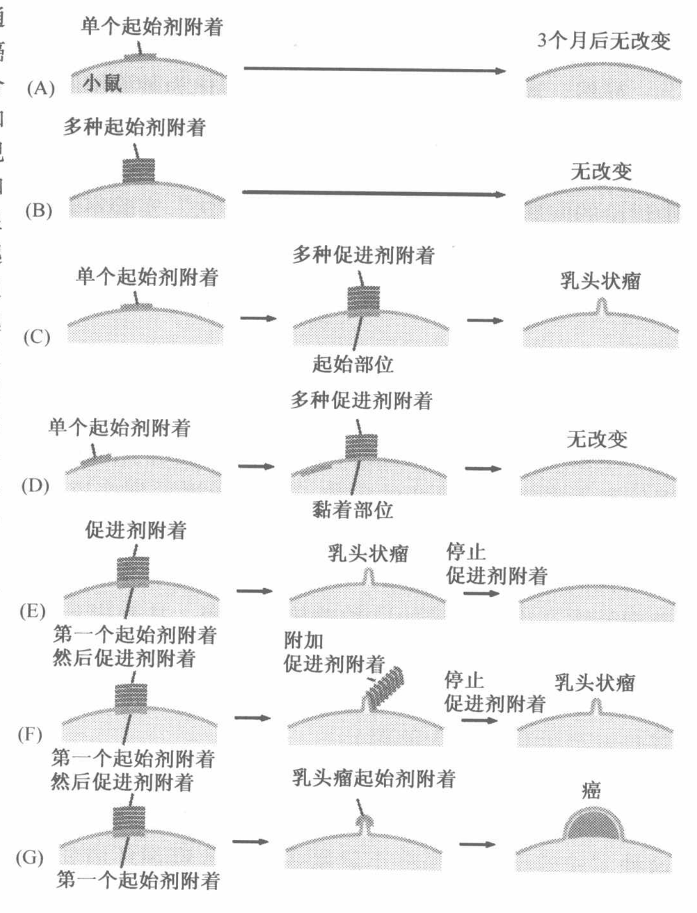


图11.28 小鼠皮肤癌产生过程 通过在小鼠背部涂抹致癌物诱发皮肤癌需要某些癌症起始剂和促进剂的综合作用。（A）使用某种起始剂（如DMBA）处理1次在3个月后没有观察到肿瘤形成；（B）促进剂（如TPA）多次处理也不能导致数量明显的肿瘤；（C）如果皮肤局部涂抹起始剂后再多次涂抹促进剂，数月后通常形成乳头瘤；（D）局部皮肤用起始剂涂抹后在其附近未重叠的皮肤反复涂抹促进剂，3个月后没有观察到乳头状瘤；（E）与（C）所描述的实验方案有所不同，起始剂（如DMBA）处理后多次涂抹TPA，最终导致乳头状瘤。然而，乳头状瘤形成后中断TPA处理可以使乳头瘤消退，提示乳头瘤进展依赖于促进剂的不断刺激。（F）与（C）描述的实验方案有所不同，乳头瘤形成后继续用TPA涂抹小鼠背部。此后，中断TPA处理。在这样的条件下，部分乳头瘤会持续发展，提示它们已经不再依赖于促进剂的刺激。（G）即使没有进一步的促进剂处理，通过（C）和（F）的方案诱发乳头瘤后采用起始剂进一步处理可以诱发肉瘤。

起初，小鼠皮肤表面的生长物需要依靠不断地涂抹 TPA，一旦停止涂抹，生长物即会退化（图 11.28E）。然而，持续涂抹 TPA 数周后，停止使用 TPA 涂抹，TPA 依赖性乳头瘤则不会退化而保持一段时间的继续生长状态（图 11.28F）。经过大约 6 周的时间，有些 TPA 依赖性乳头瘤进化成恶性程度更高的皮肤癌。

然而，如果缺乏早期 DMBA 的处理，即使重复涂抹 TPA 也不能诱导乳头瘤或癌的产生（图 11.28B）。更有趣的是，使用 DMBA 处理小鼠皮肤的某一区域，一年之后该区域即恢复正常；然后再次使用一系列的 TPA 处理小鼠皮肤（图 11.28C），则可在该区域诱导乳头状瘤的产生。

上述实验结果如图 11.29 所示。一个单一的**启动因素**（或**启动子**）如 DMBA 可以在细胞或细胞簇上产生稳定持久的标记，这些标记表面上是某种类型的遗传学改变。然后反复将已经暴露于这些启动因素的细胞暴露于 TPA 后导致细胞急剧增殖。局限增殖的起始细胞受到启动因素的刺激后最终可以形成乳头瘤。然而，就像我们曾经提到的，一旦停止 TPA 的暴露，那么已经产生的乳头瘤即会消失。因此，启动因素的效应是可逆的，提示我们可能存在一种非遗传的因素导致了乳头瘤的产生。很明显，这种非遗传学因素无论是否来自于自然界，它可以与遗传因素共同驱动细胞的增殖。

如上所述，如果用 TPA 处理早期的细胞几个月后，最终产生的乳头瘤则具有 TPA 依赖性；在这里，即使停止使用 TPA，乳头瘤仍然继续生长并且发展为皮肤癌。这一稳定的细胞行为学改变代表了一种独立的遗传学变化。确实，这一癌变的过程在导入了第二种因素后得到了加速（图 11.29）。肿瘤发生的第三步就是进展；此时肿瘤生长的速度更快，细胞从正常完全转变为恶性状态。

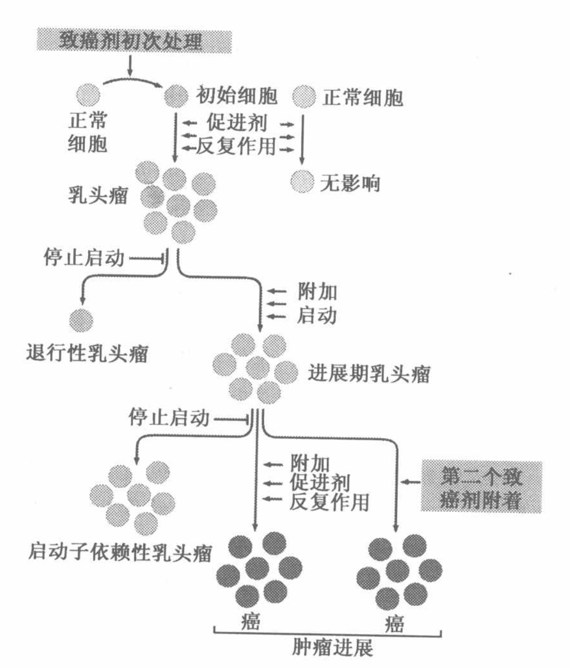


图 11.29　小鼠早期皮肤癌进展模式　图 11.28 观察到的结果可以由本图解释。采用致癌剂将一个正常细胞（灰色，顶端左边）转变为一个突变的初始细胞（蓝色）。初始细胞用 TPA 反复处理后会产生乳头瘤（蓝色细胞群），而经 TPA 处理的正常的邻近细胞（灰色，顶端右边）没有此作用。乳头瘤形成后中断促癌剂处理会使肿瘤消退（中间，左边）。而初始的乳头瘤经促癌剂进一步处理会产生恶性度更高的乳头瘤（橘色细胞），此乳头瘤在促癌剂中断后仍然持续发展（底端，左边）；此恶性度较高的乳头瘤经过 TPA 进一步处理可能最终导致肉瘤（底端中间，红色），但发生率较低。或者，初始的乳头瘤用另外一种致癌剂处理也会产生能够导致肉瘤的双重突变细胞（底端右边，红色）。

成功诱导小鼠皮肤癌产生后，促进皮肤癌发生发展的基因和蛋白质也被发现了（图 11.30）。DMBA 作为一种初始的致癌剂在小鼠皮肤癌的形成过程中确实起很重要的作用（信息栏 11.11）。由于随机的诱变剂作用，DMBA 在细胞基因组中创造了一个广泛

的突变环境。然而，皮肤肿瘤细胞常常会出现 H-*ras* 基因的点突变，说明皮肤细胞中一些特殊的突变体等位基因表现出了强大的选择性优势。

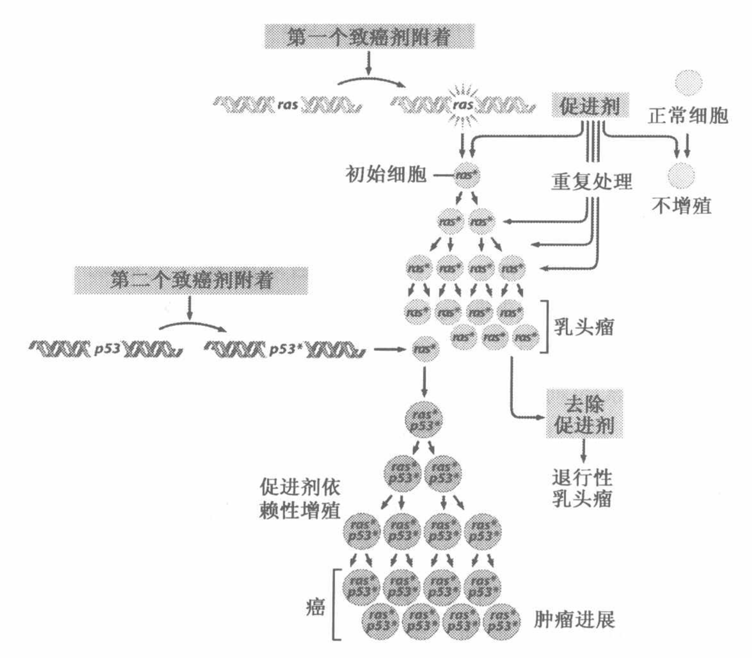


图 11.30 参与小鼠皮肤癌发生的基因与蛋白质 肿瘤起始和促进的现象可以用本图描述的方式从分子及生物化学水平来理解。致癌剂作为突变剂使 *ras* 原癌基因转变为活化的癌基因（顶端左边）。这个起始过程本身对携带此突变等位基因的角质形成细胞的生物学行为没有影响。然而，促癌剂的反复刺激会诱导这些携带突变基因的细胞反复进入生长分裂周期，最终导致乳头瘤的形成（蓝色细胞）。相反，缺乏 *ras* 癌基因的细胞不能对促癌剂作出反应。促癌中断后，乳头瘤会消退。然而，如果乳头瘤再次暴露在另外一个致突变的致癌剂（左）下，第二个遗传病变就会产生。这个二次变异通常涉及抑癌基因 *p53* 的突变。突变的 *p53* 等位基因和 *ras* 癌基因协同产生一个不再依赖于促癌剂的细胞群体（浅橘色），这些细胞能够形成肉瘤。

信息栏 11.11 分子分析显示启动作用是由早期致癌物质的直接作用导致的 实验室小鼠皮肤癌模型的建立为我们验证某些动力学问题提供了条件。例如，通过反转录病毒载体将 H-*ras* 癌基因导入小鼠皮肤细胞，模仿 DMBA 初始细胞癌变的生物学功能，从而进一步影响 TPA 启动子的功能。这一结果说明了当致癌因子足够多时能够产生 H-*rod* 癌基因的活化，并且进一步产生更多的癌变细胞。

小鼠皮肤癌模型的建立还存在其他问题：启动因素如 DMBA 或 3-MC 等致癌物是直接活化原癌基因而产生癌基因的吗？还是间接的作用于某些中介分子而产生早期突变的？

当小鼠皮肤最早暴露于 MNNG 或 MNU 等致癌物时，肿瘤细胞表现出来的是 G 到 A 的突变；相反，当小鼠皮肤暴露于 3-MC 时，肿瘤细胞表现出来的是 G 到 T 的突变；而 DMBA 的刺激则表现为 A 到 T 的突变。由此可见，核酸的置换是按照已知的诱变剂而发生改变的。

由于特殊的碱基置换反映了与化学特性相同的诱变剂，因此足以反映小鼠皮肤癌中早期的致癌分子与特殊碱基相互作用的关系。

有研究表明，重复使用 TPA 处理小鼠皮肤诱导乳头瘤的产生是因为这种启动因素和 H-*ras* 基因共同作用的结果。使用 TPA 处理乳头瘤足够长的时候后，即使停止使用

TPA 处理，乳头瘤细胞仍然保持继续生长状态。或者，如果乳头瘤细胞受到诱变剂的照射后，再次照射即可以在细胞中产生类似 DMBA 的因子，进而诱导细胞发生恶性转化。

从信号转导水平上研究这类现象（图 11.31），我们可以发现 TPA 启动因子类似于一种蛋白，通过激活细胞内丝氨酸-苏氨酸激酶（蛋白激酶 C）来促进细胞增殖。更加确切地说，TPA 模拟甘油二酯的功能，激活蛋白激酶 C 后促进细胞的增殖（PCK，图 6.16）。蛋白激酶 C-α 下游效应器与 H-*ras* 基因相互作用并刺激早期角质细胞产生最终形成肿瘤的机制仍然未知。通过以上这些对小鼠皮肤癌的研究（图 11.28、图 11.29、图 11.30），我们得出了这样的结论：化学诱变剂如 TPA，并不是直接作用于细胞基因组，而是作为一种重要的功能因子驱动肿瘤的进展。

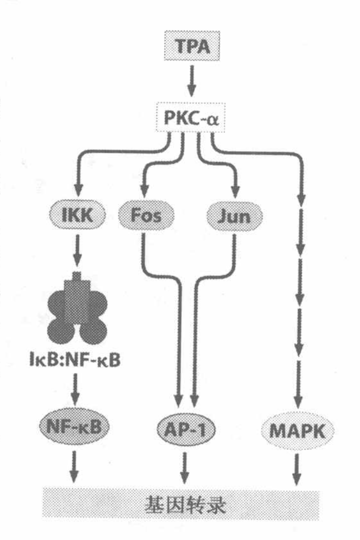


图 11.31　*Fos*、*Jun*、*NF-κB* 等癌基因的激活　活化 *ras* 癌基因和 TPA 激活的蛋白激酶 C（PKC）协同促进角质形成细胞增殖的确切机制仍然不清楚。显然 PKC 一旦通过结合 TPA 活化后，便能够刺激多条不同信号通路的转录，包括涉及 NF-κB 和 AP-1 转录因子及 ERK/MAPK 的通路。这些生化改变仍未能解释为什么 TPA 能够刺激携带 *ras* 癌基因的初始角质形成细胞增殖而对邻近的野生型角质形成细胞作用极小。

11.14　毒素和有丝分裂剂在促进人类肿瘤进展过程中的作用

小鼠皮肤癌的实验模型有助于阐述肿瘤的起始和进展。然而，这一模型无法告诉我们人体是如何产生肿瘤的。事实上，许多生物化学和生物学机制都能够促进人类肿瘤的产生。毒素和有丝分裂剂的作用是导致各种人类肿瘤产生的两种常见方式。

细胞毒性机制促进肿瘤的一个典型事例就是口腔和咽喉肿瘤（常称为头颈肿瘤）。这些肿瘤常见于饮烈酒的烟民。事实上，长期的吸烟习惯加上经常饮用烈酒可以使某些头颈肿瘤的风险增加 100 倍以上。

香烟燃烧产生的烟雾中含有丰富的致突变剂，包括 3-甲基胆蒽（3-MC）。相反，酒精具有相对较弱的致突变性。烈酒诱导肿瘤的发生在于其对口腔和喉黏膜上皮细胞的毒性作用，饮用含高浓度酒精的饮料后能导致大量细胞死亡脱落。上皮组织中的干细胞通过分裂来再生口腔和喉黏膜上皮细胞，正常情况下这些干细胞以较低的速率进行分裂，但是酒精可以加速有丝分裂从而导致的大量的上皮细胞脱落。

香烟中的焦油可以诱导携带突变等位基因的口腔和喉黏膜细胞产生，进一步在酒精的刺激作用下这些细胞发生增殖异常。酒精的促进作用导致这些初始细胞进行克隆增殖

从而使其子代演变成临床上进展性头颈癌。这是毒素作为促癌剂的一个典型例子。

广义上说，组织中某些细胞群体中存在众多高度毒性的化合物。这些毒性物质可以导致耐受这些毒物的细胞增殖，从而促进肿瘤发生。某些类型的人类肿瘤能很好地阐释肿瘤进展中这些细胞毒性物质所产生的作用（信息栏 11.12）。

信息栏 11.12　一种罕见的恶性肿瘤综合征阐明了肿瘤进展过程中细胞增殖的重要作用　Kostmann 综合征是一种罕见的遗传性综合征，由于能够杀灭血液中的细菌和真菌能力的中性粒细胞完全缺失而导致。在这类常染色体显性遗传病中，遗传性缺陷诱导的综合征导致了突变体的产生。中性粒细胞特异性弹性酶（一种蛋白酶），表达于正常分化的中性粒细胞中。Kostmann 患者体内的弹性蛋白酶突变对中性粒细胞具有细胞毒性，一旦其表达水平显著升高时，中性粒细胞则发生凋亡，导致其数量减少（图 11.32）。骨髓中的祖、干细胞受中性白细胞减少症（血液中中性粒细胞减少）的刺激而分化并大量增殖。在一些患者中，由于干细胞的不断分化，经过几年的时间后，结果导致了骨髓中产生的白细胞数量急剧增加。这种综合征为我们提供了一个有力的证据，细胞毒素因子可以直接作为肿瘤进展的启动因子。

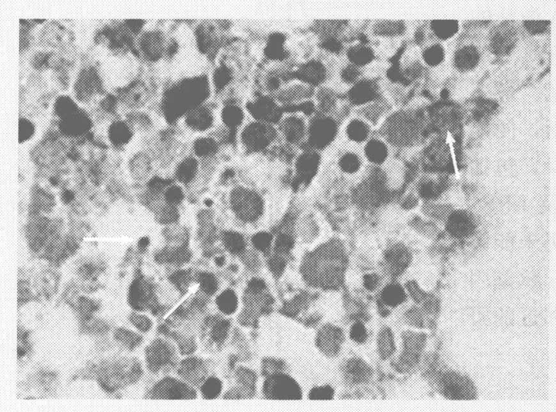


图 11.32　婴儿型遗传性粒细胞缺乏症（Kostmann 综合征）　Kostmann 综合征的临床表现是骨髓分化的中性粒前体细胞进行性减少。箭头指向通常数目巨大的凋亡小体，即细胞凋亡通路活化后产生的细胞片段。此凋亡可归因于细胞合成了一种突变的、有毒的弹性蛋白酶变异体。（From G. Carlsson. A. A. Aprikyan, R. Tehranchi et al., Blood 103:3355-3361,2004.）

事实上，有丝分裂素也可以作为促癌剂。其中最突出的例子是类固醇激素——雌激素、孕酮和睾酮。例如，在女性体内雌激素和孕酮参与生殖组织的细胞增殖。女性**月经初潮**和绝经期之间的月经周期引发乳腺导管上皮细胞的增殖和退化（图 11.33）。子宫内膜上皮经历相似的增殖和退化周期。

流行病学调查显示女性个体在一生中月经周期的次数越多，乳腺癌的患病风险越大。据估计，青春期月经初潮每推迟 1 年终身乳腺癌风险下降 20%（月经初潮时间的重要性最令人信服的证据来自对患乳腺癌的同卵双胞胎的研究；月经初潮早的双胞胎首先诊断为乳腺癌的风险是其同胞的 5.4 倍）。45 岁之前绝经的妇女患乳腺癌的风险仅为 55 岁或以上才绝经的妇女的一半。

作为女性体内雌激素主要来源器官卵巢的切除可以降低乳腺癌风险。荷兰的一项研究进一步证实了这一观察结果，该研究显示由于何杰金淋巴瘤化疗的副作用在 36 岁之前绝经的妇女随后发生乳腺癌的风险下降 90%。相反，发生乳腺癌的绝经后妇女平均的血清雌激素水平比正常妇女高 15%。

雌激素对乳腺癌的影响的确是复杂的，它似乎对乳腺上皮细胞外的其他细胞有作用。然而，雌激素（也许包括孕酮和催乳素等其他激素）的一个明显的作用是可以周期性诱导

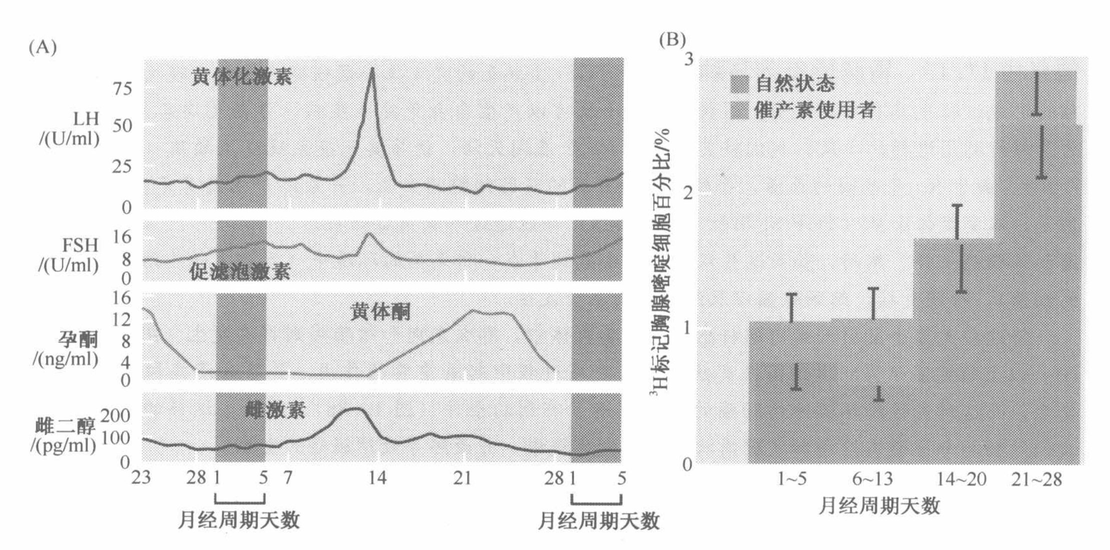


图 11.33 月经周期中激素水平，细胞增殖和乳腺形态学 在黄本酮、催乳素以及雌激素周期性的刺激作用下，乳腺上皮细胞不断增殖，增加了乳腺发病的风险。（A）月经周期中的激素水平。（B）周期性循环导致细胞增殖产生强烈波动。采用组织活检中有标记的胸腺嘧啶核苷的细胞百分比来表示月经周期天数。（A，from R. A. Rhoades and R. H. Pflanzer，Human Physiology. Philadelphia：W. B. Saunders，1996；B，from T. J. Andersan，S Battersby，R. J. King et al.，Hum. Pathol. 20：1139-1144，1989.）

细胞增殖，从而允许乳腺上皮细胞（MEC）发展成为在各种类型乳腺癌中发现的 MEC。（有些人认为雌激素的代谢物具有致突变性，这些代谢物促进乳腺癌的发生；如果是这样的话，雌激素的致突变效应很明显被它促进 MEC 增殖的能力掩盖了）。

在这个例子中，我们面对的是一个哺乳动物机体内源性的促癌因素而不是某个外来的因素。然而，这个激素的作用机制十分符合经典促癌剂的特性。

11.15 慢性炎症促进肿瘤进展

相对而言，很少有人类肿瘤诱变剂是完全通过细胞毒素或促有丝分裂的机制而（11.14 节）发挥作用的。大多数的克隆性增殖看起来像是由炎症所驱动的。这些都是从小鼠皮肤肿瘤模型的启动过程给我们的提示（11.3 节）。显然，这种实验模型是人为制造的，在哺乳动物体内导入促癌因子（TPA）并不易诱导皮肤肿瘤的发生。但是，TPA 能够刺激小鼠皮肤并诱导皮肤局限性炎症发生，这就是为什么我们要选择 TPA 作为促癌因子的原因。

种种研究表明，炎症在肿瘤启动过程中普遍存在。例如，将人类结肠癌细胞系接种到裸鼠皮下组织不能使裸鼠致瘤，而将它们与塑料制品碎片共同接种宿主小鼠后，塑料制品碎片诱导局部间质性炎症产生腺瘤或形成肿瘤。即使将这些具有的致瘤表型细胞移植到其他宿主动物，也不能导致宿主成瘤，这说明肿瘤形成是受到某种稳定的遗传或表现遗传改变所驱动的。小鼠胃肠道肿瘤形成过程的研究同样支持以上观点，即炎症在结肠癌形成过程中发挥着重要作用（信息栏 11.13）。

信息栏 11.13　胃肠道炎症与肿瘤　对 TGF-β1 缺乏的突变体小鼠研究，我们发现炎症在结肠癌的形成过程中具有重要作用。这种突变体小鼠可以产生自身免疫性疾病，并在几周后发生死亡。为了好好利用这样的小鼠，我们将其生殖系 *Rag2* 基因灭活，诱导其免疫系统发生缺陷（见信息栏 7.10）。由于 *Rag2* 基因的灭活，导致抗原特异性的淋巴细胞的产生，并最终产生自身免疫性疾病。但是，双突变体小鼠（TGF-β1 阴性/Rag2 阴性）却能通过结肠炎症而存活 3～6 个月，正如结肠腺瘤和结肠癌一样。然而，如果这些双突变体小鼠饲养在一种无菌的环境中（只产生一些结肠内平常的细菌），结肠炎症，结肠腺瘤以及结肠癌则不会发生。

将这些无菌小鼠引入幽门螺杆感染的动物群体中，那么息肉和结肠癌则再次发生（图 11.34A、B）。以上研究显示胃肠道细菌在炎症的发生发展过程中起着重要的作用，并导致溃疡性结肠炎的发生，而这种炎性的环境为结肠癌的发生创造了有利的条件（图 10.36）。此外，这样的结果提示我们结肠局部区域炎症增加了腺瘤状息肉的发生概率，并最终导致结肠癌的发生。

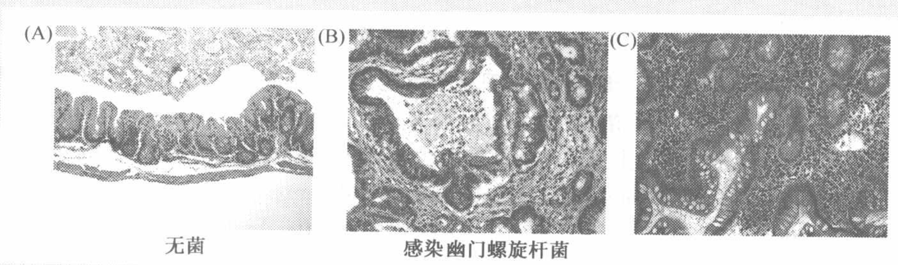


图 11.34　结肠炎症和肿瘤启动　结肠腺瘤和癌的发展主要依赖于结肠的慢性炎症。因此 缺乏 TGF-β1 的遗传修饰小鼠在早期由于自身免疫性疾病而死亡。(A) 然而，如果它们的免疫系统是通过一种需要 T 细胞受体基因和编码功能蛋白抗体的 Rag-2 酶灭活而产生的，那么这些小鼠将会存活下来，而且其肠上皮细胞的组织学形态仍然保护正常。(B) 相反，当双突变小鼠在幽门螺杆菌的作用下，其结肠开始感染细菌并且发展成腺瘤和癌。这就说明，肠内细菌的存在加速了慢性炎症对肠道的损害。(C) 人溃疡性结肠炎包括局部的肠黏膜损伤，在这种情况下，会有大量淋巴细胞浸润于结肠黏膜基质，这将增加若干年后细胞发生癌变的风险（呈现暗紫色小细胞核）。(A and B, from S. J. Engle , I. Ormsby, S. Pawlowski et al., Cancer Res. 62: 6362-6366, 2002; C, courtesy of D. Lamarque).

慢性炎症在人类肿瘤的发病机制中也起到非常重要的作用。例如，胆囊癌的发生通常伴随着很长一段时期的胆道结石和炎症。同样，在东亚（信息栏 11.14）比较常见的肝细胞癌也伴随着 HBV（B 型慢性肝炎病毒）的感染和肝炎（图 11.35B）。HBV 在个体感染的早期就一直伴随着，并以激活形式稳定的存在很多年。HBV 不断地诱导并杀死正常细胞，增加了肝脏剩余正常细胞的代偿从而补充坏死的肝细胞。

信息栏 11.14　HBV 感染和肝癌的发生存在相关性　流行病调查研究得出的结论使我们很难判断偶然的环境因素暴露与某种继发的肿瘤风险增加之间是否存在密切的联系。然而，全世界范围内备受关注的肝癌发病率增加又促使我们将诱发因素与肝癌的发生密切联系在一起。在某些地区如亚洲的中国和非洲撒哈拉以南，肝细胞癌（肝癌）是导致的死亡率的首要因素；相反，在美国，肝细胞癌所导致的死亡率在肿瘤相关死亡率中仅仅只排在第 25 位。

HBV 基因组中发现一种被称为 *HBX* 的基因，HBX 表达弱致瘤性和促凋亡能力，但

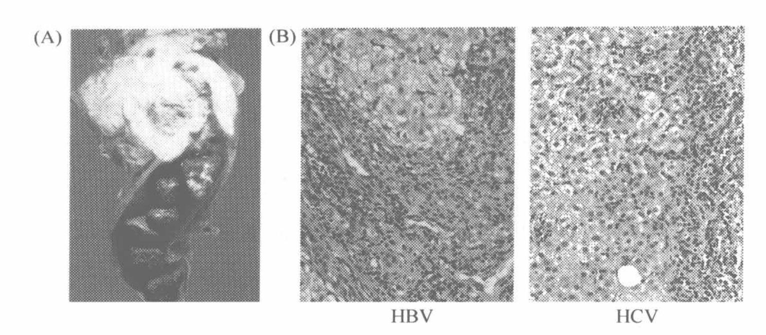


图 11.35 结肠炎症导致癌症发生 （A）图说明，慢性炎症导致肿瘤是胆囊的内层上皮细胞的癌变的结果（白色巨块，上方）一般合并出现促成从胆汁形成胆结石。（B）HBV 感染使肝实质细胞持续死亡，加之慢性炎症损伤（大量致癌的细胞核）。经过 10 年之久，就会累积成患肝癌 100 倍的风险，感染 HCV 的患者的情况类似（右图），被感染的细胞在右边的显微照片中，说明了这个事实，两种感染是非常相似的，都可以加速患肝癌的风险，可见这种炎症状态比特效的滤过性毒素致病，更能加速 HCC 形态学改变。（A，from A. T. Skarin. Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia；Elsevier Science Ltd；2003；B，left-courtesy of A. Perez Atayde，right-courtesy of A. K. Bhan.）

是只通过这个基因是很难解释在受到 HBV 感染后数十年内肝细胞癌是如何发生的。我们需要研究其他的肝细胞癌发病机制。HBV 可能是作为一种非癌基因反转录病毒的形式导致肝细胞癌的产生。回到病毒这个话题，我们知道，禽类白细胞增生病毒（ALV）和鼠白血病病毒是很难诱导肿瘤形成的。一旦经过几个月的时间，这些病毒同样导致了肿瘤的发生，可能是因为这些病毒偶然地整合了位于某种控制细胞生长的原癌基因附近的前病毒（3.11 节），造成了这种原癌基因的表达异常并激活形成癌基因，进而导致了肿瘤的形成。

然而，在 HBV 诱导肝细胞癌的产生中，情形却大不相同。大量的分子生物学研究发现，HBV 基因组并没有与某些关键性的细胞生长控制基因如 *myc* 原癌基因相整合。因此，HBV 不可能作为直接的诱变剂感染肝细胞。

存在以下两种可能来解释病毒诱导癌症的产生。HBV 可能具有促进机体组织器官细胞增殖的能力，而这种增殖的细胞取代了被 HBV 杀死的肝细胞。或者是由于 HBV 的感染，机体免疫系统为了清除这些受感染坏死的细胞，在肝脏中产生了一种炎性的环境（图 11.35B）。这两种机制可能共同作用导致肿瘤的产生。

随着近几年的研究，慢性肝炎病毒 C（HCV）感染导致的肝癌发病率增加已经非常明确。然而这两种病毒的作用在基因组结构和复制周期改变中是完全不相关的，但它们同样具有引起慢性感染，细胞毒性作用和炎症反应的能力，并且产生相同的生物学结果（图 11.35B，右侧）。值得注意的是，在其他许多类型的慢性感染包括酒精中毒过程中，肝细胞癌的发病率也有在不断增加，尽管其相对风险不如 HBV 感染所导致的肝细胞癌。）

HBV 作为一种致癌因素，也能与黄曲毒素-B1（一种由霉菌在高湿度的花生、坚果和玉米中产生的高致癌性的化合物）共同作用。这种结合感染加上黄曲霉毒素的暴露是十分关键的。在上海地区展开的一个小型的流行病学研究表明，HBV 的感染使得肝细胞癌的发病风险增加约 7 倍；而食用了受黄曲霉素污染的食物后发病风险增加约 3 倍；

而当 HBV 感染和黄曲霉素暴露同时存在时，发病风险则增加约 60 倍。类似的作用机制在小鼠皮肤癌发病过程中也很类似。

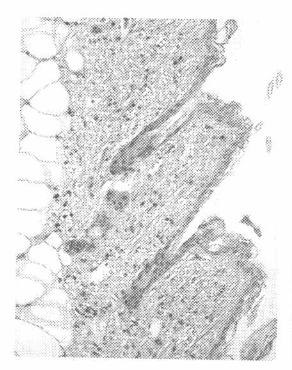
其他一些感染因子也能产生炎症反应，起源于胃黏膜相关淋巴样组织的淋巴瘤就是一个典型的例子。75%的胃黏膜相关淋巴瘤可以通过使用抗生素杀灭幽门螺旋杆菌而治愈，这些胃黏膜相关淋巴瘤需要刺激因子的持续性作用。而另外 25%的淋巴瘤则不需要刺激因子的持续性作用，这可能是因为它们的细胞中第 11 和第 18 号染色体易位造成的。

11.16　炎症信号转导通路对肿瘤的促进作用

炎症在肿瘤发生、发展中的作用来自于大量的流行病学调查：抗炎药物，如阿司匹林和舒林酸，能减少各种人类肿瘤的发病率。例如，在对服用低剂量的非甾体类抗炎药的研究中指出 NSAID——一种阿司匹林的片剂，以每天或间隔一天服用，持续 15 年——患肺癌的风险为 0.68，乳腺癌（女性）的风险为 0.70。同时，在年轻男性中，结直肠癌的发病率为 0.35。另一个流行病学的前瞻性研究发现：在大量服用阿司匹林长达 7 年的妇女，其患胰腺癌的风险为对照组的一半。这两项研究说明常规使用阿司匹林（或非甾体类抗炎药）使得感染幽门螺杆菌（在人的胃中定居的一类细菌）个体患胃癌风险减少了 40%（除了贲门）；在未感染的人群（对照组）中通过服用阿司匹林，胃癌发病率并未减少。同时，其他研究显示了非甾体类抗炎药能降低卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌的死亡率。

（上述结果可能提示非甾体类抗炎药能降低某些心血管疾病的死亡率，从而成为临床上防治的常规用药。然而，另一个公共卫生统计研究显示：在 1998 年中，与因服用非甾体类抗炎药引起的胃肠道并发症而死亡的病例为 16 550。）

通过对长期使用非甾体类抗炎药能减少肿瘤发生的流行病学调查，同时对小鼠皮肤癌和肝癌的相应实验中显示：在许多组织相关性的肿瘤发生中，这类药物在生物化学和细胞生物方面的机制有待研究。一项重要线索证明了蛋白激酶 C-α（PKC-α）是细胞的 TPA 的下游靶点。更引人注意的是，鼠的皮肤炎症通过角质层细胞过度表达 PKC-2，这个酶在介导 TPA 诱导的这类炎症中扮演重要的角色（图 11.36）。



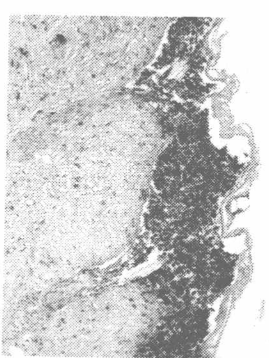


图 11.36　TPA 诱导小鼠皮肤肿瘤　TPA 的炎症效应充分显示在转基因小鼠形成过程中高表达 PKC-α 含有 TPA 靶点的细胞以及角质细胞中（皮肤组织中角蛋白 5 转录启始部位驱动 PKC-α 的表达）。野生型小鼠和转基因小鼠经 TPA 处理 18h 后，野生型小鼠皮肤中几乎没有中性粒细胞（左图，黑点），它是一个重要的免疫调节环节。相反，通过特异性的抗体可以检测到转基因小鼠皮肤上存在广泛的中性粒细胞浸润。（From C. Cataisson. E. Joseloff, R. Murillas et al., J. Immunol. 171: 2703-2713, 2003.）

在经过 TPA 处理的角质细胞中，PKC-α 信号通路一方面通过激活 IKK（IκB 激酶）而导致 IκB（NF-κB 的抑制剂）发生磷酸化，进一步使 NF-κB 活化，导致 NF-κB 从胞浆移向细胞核（见图 6.29），从而影响到下游一系列基因的转录。而在那些能够阻止细胞凋亡和促进细胞增殖的基因中，NF-κB 同样能诱导 TNF-α（肿瘤坏死因子-α）的表达。TNF-α 是一种能诱导免疫细胞（如某种细胞因子）在小鼠皮肤以及其他上皮组织中产生局部炎症反应的诱导剂（肿瘤坏死因子-α，顾名思意，最初发现其能诱导肿瘤细胞坏死，然而，当它的作用不断扩大，所累及的区域就会造成明显的组织炎症反应）。

缺乏 TNF-α 基因拷贝及其他相应致瘤因素（如 DMBA 启动子和 TPA 启动子）的小鼠与野生型小鼠一样，其皮肤癌发病率增加了 5%～10%。对后者（野生型）进行 TPA 处理能引起表皮角化细胞中 TNF-α 的生成，从而导致真皮层的基质细胞发生炎症反应。如上所述，综合为以下的信号通路：

$$TPA \rightarrow PKC\text{-}\alpha \rightarrow\rightarrow IKK \rightarrow\rightarrow NF\text{-}\kappa B \rightarrow TNF\text{-}\alpha \rightarrow inflammation$$

另一个小鼠的肿瘤模型，通过小鼠种系中 Mdr（multi-drug resistance）多重耐药基因的缺失能诱发肝癌（信息栏 7.10）。该基因和相关编码蛋白产物的缺失能导致胆汁酸的积聚和慢性肝炎的产生。受累的小鼠其肝细胞发育异常，形成小瘤——局限性肝细胞癌（HCC），最终发展为转移型。

在这些小鼠的肝脏中，TNF-α 初始为炎症的内皮细胞所释放，并同时在基质中浸润着大量诸如中性粒细胞和巨噬细胞等免疫细胞。其有 TNF-α 的相应受体，像角化细胞中的 PKC-α，在这些肝细胞通过 NF-κB 信号通路，成为 TNF-α 激活的配体（信息栏 6.12）。正如上述所述：NF-κB 进入核中，激活了抗凋亡基因和促进增殖相关基因和 TNF-α 基因。TNF-α 的结果：一旦从肝细胞中释放出来，通过旁分泌效应引起更多的炎症细胞产生和通过自分泌途径激活 NF-κB 信号通路引起肝细胞增殖。

当在 $Mdr^{-/-}$（多重耐药基因缺失）的小鼠对其 NF-κB 信号通路阻断，肿瘤发生将被强烈地抑制（图 11.37）。这种信号通路的抑制，是通过给 $mdr^{-/-}$ 小鼠注射抗 TNF-α 抗体（阻断炎症基质细胞和肝细胞之间的旁分泌途径），或在肝细胞中抑制 IκB 的表达（抑制其对 NF-κB 活化作用）来实现的。以上两种手段，造成 NF-κB 信号的阻断而引起肝脏的癌前细胞大量进入凋亡状态。事实上，凋亡的防治很可能用来解释这类小鼠模型中，炎症在肿瘤进展中的重要作用。有趣的是，在肝细胞中，NF-κB 信号通路的关闭，并不能阻断肝癌的早期进展阶段——肝炎及肿瘤发展的起始阶段——异型增生。但随后异型增生的组织向肝细胞癌演变时，就因 NF-κB 通路关闭而阻断。因此，这种实验模型说明：TNF-α 和 NF-κB 在肿瘤形成过程中具有重要作用是启动，但不是直接的致癌原因。

通过对小鼠结肠炎诱发的结肠癌动物模型的研究，我们也可以得出类似的结论：IKK 信号的失活导致大量肠上皮细胞出现凋亡。缺失了 NF-κB 信号通路，这些细胞就失去抗凋亡基因 $Bcl\text{-}X_L$ 的表达水平缺失升高。（图 9.25）相反，可引起凋亡前体蛋白 Bax 和 Bak 大量表达。一旦这样，可以推测 NF-κB 在一些肿瘤形成中的作用可能是防止早期上皮细胞发生凋亡。

综上所述，NF-κB 信号通路在炎症组织的上皮细胞中具有高度活性（如肝脏的肝

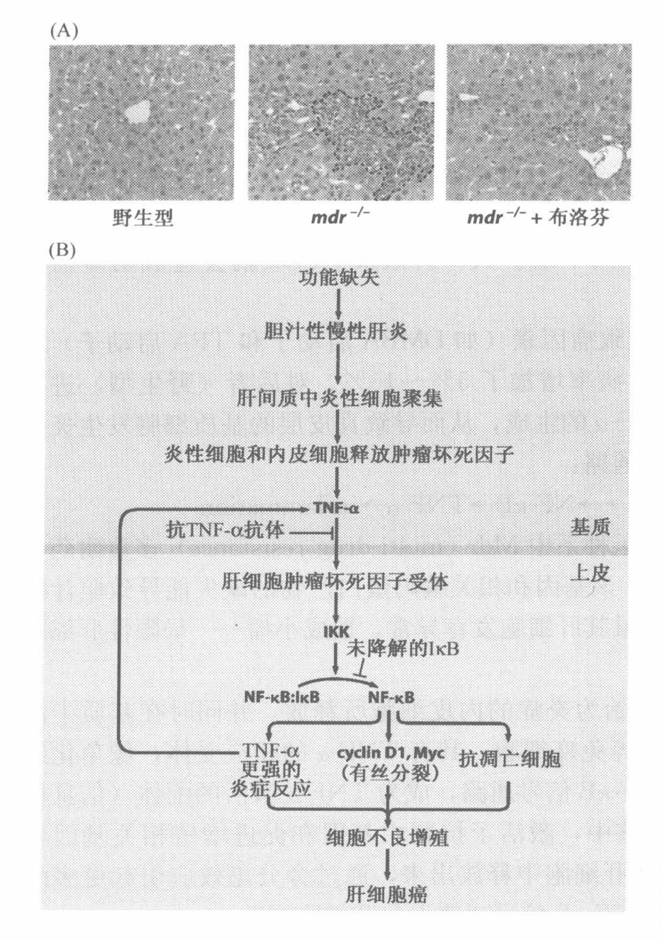


图 11.37　慢性肝炎通过 NF-κB 通路导致肝细胞癌产生　在这些致癌小鼠模型中，去除多药耐药性基因 *mdr* 引起慢性肝炎，在肝实质细胞中产生 dysplastic 聚集，促进形成肝癌。在一个有渗透炎症 *mdr*$^{-/-}$ 小鼠的细胞（显示，中间）与正常的肝脏组织（左侧）和有效地抗炎药物，布洛芬处理过的 *mdr*$^{-/-}$ 小鼠的，（右侧）比较。这些部位有炎症浸润的最终发展成肝癌。其各种步骤总结如图。一定时期的肝脏胆汁入肝脏基质形成慢性炎症，释放 TNF-α，它可以侵犯肝脏上皮之间的肝实质细胞，当被激活，TNF-α 可以结合肝实质细胞的 TNF 受体，通过 IKK 途径激活 NF-κB 信号通路。从而导致许多抑制凋亡基因的激活如 Bcl-X_L，促增殖基因如 cyclin D1 和 TNF-α 等，这些有功能的蛋白，同时使肝细胞不良增殖，最终发展成肿瘤。这个过程可以被与 TNF-α 起反作用的抗体的和不可降解的负调控 IκB 所阻断。（此图未解释抗炎药物的作用）（A，from E. Pikarsky，R. M. Porat，I. Stein et al.，Nature 431：461-466，2004.）

细胞、结肠的肠上皮细胞等）。通过免疫系统的炎症细胞而产生的炎症反应（如巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞和淋巴细胞等）能进入这些组织的间质复合物中，形成浸润，释放促炎症的信号因子。尤其是 NF-κB 信号通路在基质的免疫细胞中成为重中之重。能释放诸如 TNF-α 等信号分子。例如，在上面谈及的结肠炎和与之相关的结肠癌的动物模型中，在肠基质的炎症化的免疫细胞，其 IKK 的信号通路的关闭能显著抑制结肠癌的形成。

以上这些都不能解释非甾体抗炎药如阿司匹林、布洛芬、舒林酸是如何阻断肿瘤启动的。这些药物，包括其他的非甾体抗炎药的靶分子是环氧化酶 2（COX-2）（图 11.38）。事实上，COX-2 基因就是通过 NF-κB 信号通路诱导表达的。这些调节免疫应答的酶类的关键作用就是促使上皮细胞恶性转化，在遗传学修饰小鼠实验中，诱导其 *APC* 基因发生突变后可以看到小鼠结肠息肉的发生：当 COX-2 基因失活后，息肉的数量则明显减少。同样，使用药理学方法使 COX-2 酶失活后，转基因小鼠体内的肿瘤则被明显的抑制（图 11.39）。

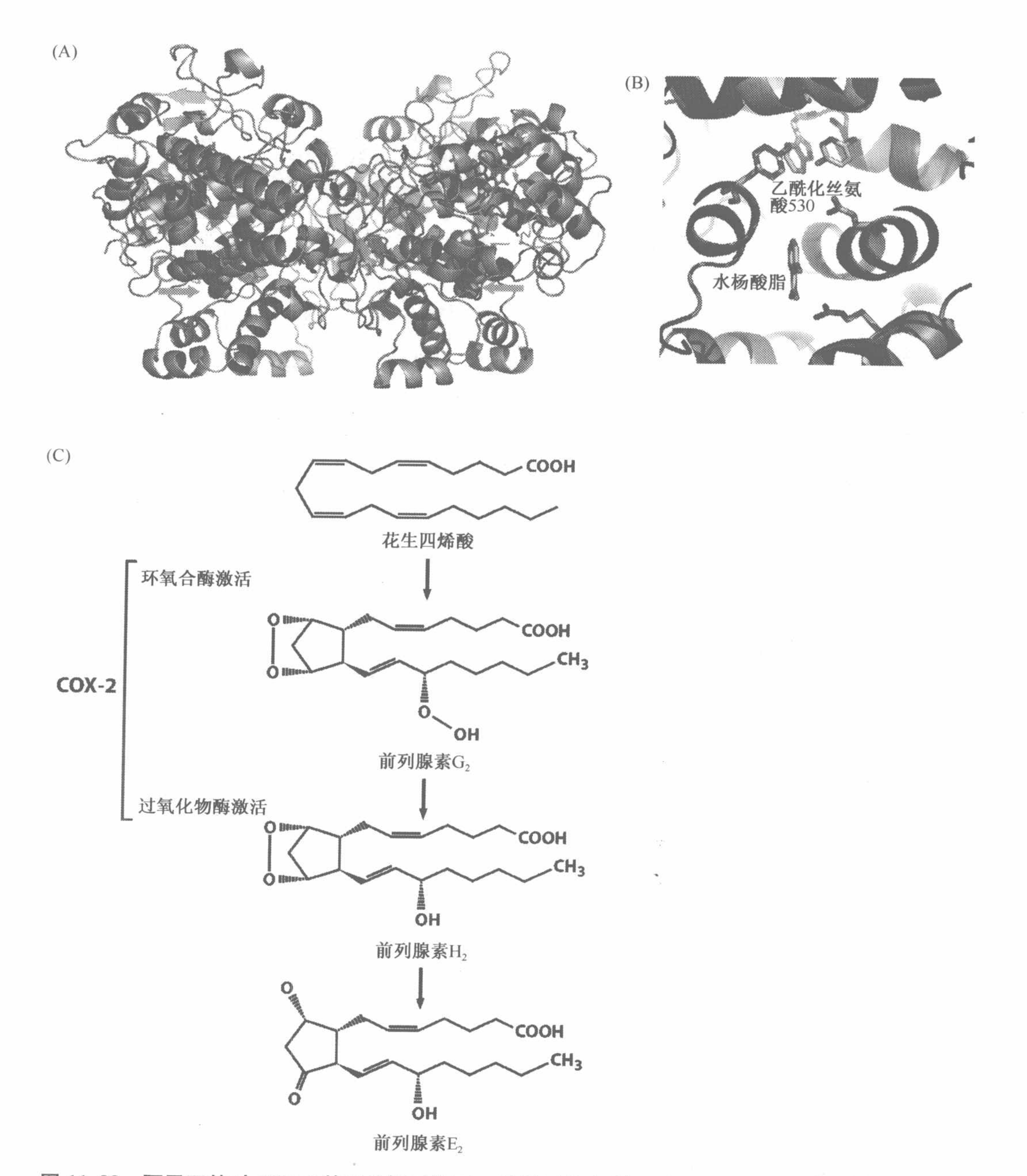


图 11.38　阿司匹林对 COX-2 基因的抑制作用　阿司匹林之所以对肿瘤具有重要意义，在于它能够与 COX-2 有接触反应，COX-2 也称前列腺素 H_2 合酶。COX-2 为适应炎症可以被许多肿瘤组织中诱导产生，不同于与它非常相似的 COX-1 酶，它是构成性的表达。(A) COX-2 是一个同型二聚体，它的活性部位使花生四烯酸转化为前列腺素 G_2，而它的活性被乙酰水杨酸、乙酰基抑制，这些可以乙酰化 COX-2 的丝氨酸 530（黄点，箭头），使部分水杨酸盐解离成乙酰水杨分子，使其接触反应的作用降低（橘黄色点，箭头）。α 螺旋（teal）、环（gray）、β 折叠（亮绿）、原血红素（红）。(B) 具体细节如下，阿司匹林与 COX-2 的接触反应可以被精确地分开，此时丝氨酸 530 的乙酰化作用阻止了酶的活性，使花生四烯酸成为前列腺素化合物的前体——前列腺素 G_2，后者被 COX-2 酶转化成前列腺素 H_2。(C) 这两种不同催化活性的 COX-2 最终导致花生四烯酸转变成前列腺素 H2，进一步形成前列腺素 E2 而导致肿瘤的启动。后者代谢成前列腺素 E2，这些可以引起提到的许多肿瘤起始部位的反应。(A and B, courtesy of R. M. Garavito.)

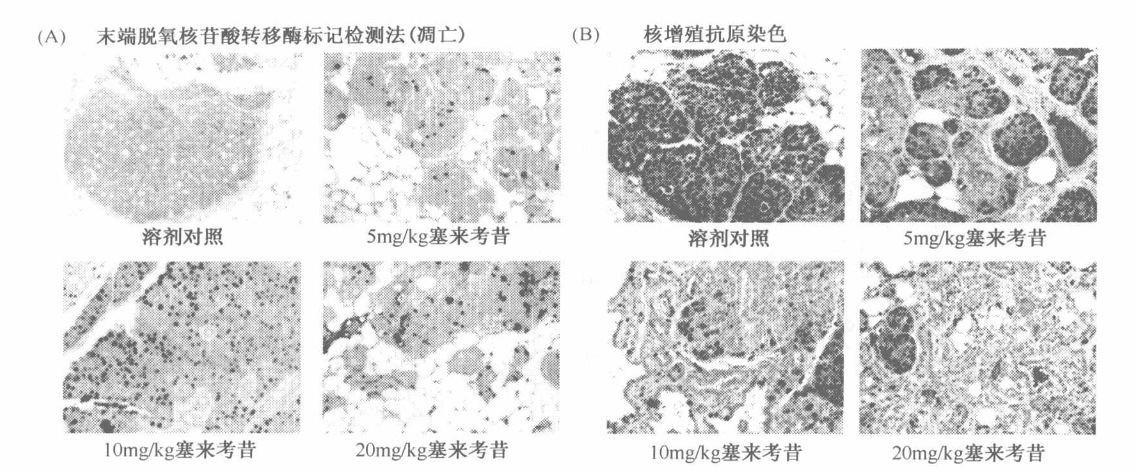


图 11.39 COX-2 在乳腺癌中的作用 在转基因小鼠乳腺癌病理模型中，恶性肿瘤的进展是由多瘤病毒属 T 癌蛋白所驱动的。非甾体抗炎药 Celecoxib 是一种有效的和选择性的 COX-2 抑制剂，用其处理小鼠后能有效地减少 T 癌蛋白的表达量。（A）如图所示，通过 TUNEL（一种凋亡标志）染色法（见补充材料图 3B◎）分析，增加药物的剂量能够导致肿瘤细胞数量显著增加（绿色）。（B）相反，通过 PCNA（细胞增殖核抗原，一种细胞周期进展标志）染色法显示，增加塞来考昔的剂量能有效减少细胞增殖。这里所示的所有病例中，塞来考昔的剂量为 1mg/kg。(From G. D. Basu，L. B. Pathangey，T. L. Tinder et al.，Mol. Cancer Res. 2：632-642，2004.）

当诱导转基因小鼠乳腺组织中 *COX-2* 基因表达上调后，可以看到相反的效应：小鼠乳腺癌的发生率明显增加。在另一组类似的实验中，*COX-2* 酶的高表达能导致皮肤异常增生和发育不良。

COX-2 基因表达于肿瘤发生早期的一些间质和其他组织的上皮细胞间质中（图 11.38）。在一些上皮组织中，*COX-2* 在上皮间质的表达促进了肿瘤的进展，其表达往往超过正常水平的 10 倍以上。

间质和上皮细胞表达 COX-2 酶可以诱导花生四烯酸产生一系列的前列腺素，其中以前列腺素 E_2（PGE_2）为主（见图 11.38C）。将这些前列腺素应用到培养的正常肠上皮细胞中可以导致一些与细胞转化相关的表型出现，如接触性抑制丧失、非锚定依赖性生长增加、E-钙黏素表达下调、细胞程序性死亡减少、细胞增殖速度增加。更重要的是前列腺素 E_2 可以促进小鼠胃肠道息肉的发生发展（图 11.40E）。

在早期的肿瘤进展过程中，前列腺素 E_2（PGE_2）在细胞与细胞间弥散，*COX-2* 基因在间质炎性细胞中表达导致前列腺素的释放，这种方式是通过附近上皮细胞旁分泌完成的。然而，随着肿瘤的进展，肠上皮细胞 *COX-2* 的表达水平不断上调，促使其自身细胞通过自分泌的形式产生 PGE_2，并最终诱导细胞转化。

结肠息肉的早期，前列腺素诱导产生炎症。随后，这些息肉进一步向肿瘤发展，并且不再依靠前列腺素的维持。这种模式可以通过小鼠皮肤癌模型实验来反映：乳头瘤的早期需要肿瘤启动因子如 TPA 的刺激，而随着乳头瘤的进展，这种依赖性逐渐消失。

11.17 肿瘤启动决定了肿瘤进展的速度

肿瘤的启动过程中存在大量的启动因子（表 11.3），它们具有共同的能力启动早期克隆性增殖。它们在多阶段致癌过程中的机制可以在图 11.12、图 11.17 和图 11.18 中所描述的克隆演变模型中找到答案。为了使初始细胞获得一个附加的突变，首先它的同源后代数量要多，其次发生突变的可能性小，这样才能促使一个或另一个细胞克隆增生。没有这样的克隆增生，下一次的突变将不可能导致单一的子代细胞突变，而使肿瘤进展停止。

表 11.3　人类肿瘤启动因子及其作用位点

因素或过程	肿瘤位置	因素或过程	肿瘤位置
激素类		化学因子	
雌激素	子宫内膜	槟榔，石灰	口腔
雌激素和黄体激素	乳腺	烟草	口腔
排卵	卵巢	胆汁	小肠
睾丸酮	前列腺	盐	胃
药物类		酸返流	食管
口服避孕药	肝	物理或机械性创伤	
镇痛药	肾盂	石棉	间皮，肺
利尿剂	肾	胆道结石	胆囊
传染性因素		粗粮	胃
肝炎病毒 B/C-血吸虫	肝	头部损伤	脑膜
埃及血吸虫-血吸虫	膀胱	慢性刺激/炎症	
睾吸虫-肝吸虫	结肠	热带性溃疡病	皮肤
幽门螺旋杆菌-细菌	胆管	慢性溃疡性结肠炎	结肠
疟原虫感染	胃	慢性膀胱炎	膀胱
结核分枝杆菌	B 细胞	慢性胰腺炎	胰腺

各种各样的肿瘤启动机制都会促进肿瘤进展向以下三条途径发展。第一，启动因子可能诱导克隆性生长，使得大细胞群体的不可能事件转变为可能；第二，细胞增殖需要 DNA 复制，而在 DNA 复制的过程中经常出现 DNA 序列的突变，而反复的细胞分裂也可能给细胞内基因组造成损伤，有丝分裂重组和错误的染色体分离则会导致抑癌基因杂合性缺失（LOH）的发生，进而促进肿瘤的进展；第三，反复的增殖和分裂可能导致干细胞中末端着丝粒的染色体 DNA 的缩短。随后，端粒缩短和融合桥周期破坏进一步导致染色体核型紊乱并产生突变。正如 10.10 节所讲到的，融合桥周期发生功能性缺失可能直接导致癌症发病率的上升。

事实上，有一类肿瘤启动因子，包括炎症，可能在肿瘤进展过程中产生一些附加的效应。如炎症细胞进入组织后释放一种活性氧物质（ROS），它们可能导致其周围上皮

综上所述，各种上皮细胞中炎症作为一种促癌因素在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用（图 11.41）。这一假说正在被修正，其中最不确定的因素就是 NSAID 对肿瘤的抑制作用：COX-2 是一个很明确的 NSAID 作用靶分子，其他一些酶类也是这种药物的靶分子，因此，抑制这些酶类同样也能减缓或阻止多阶段致瘤过程。

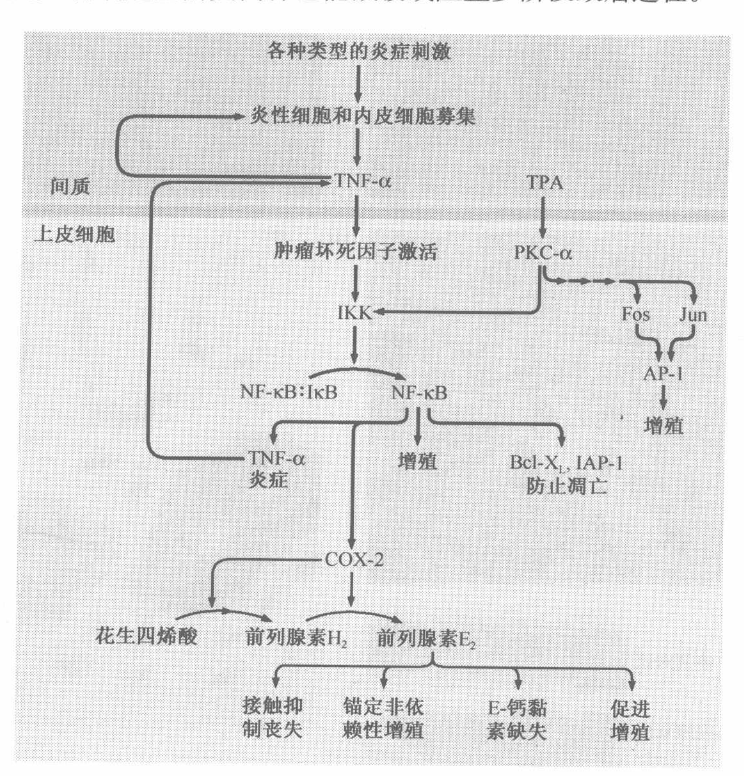


图 11.41　上皮细胞炎症模型和癌变发生　如图 11.30 所示，皮肤癌和肝癌的诱导可能包含着一个更加普遍的模式。炎症的刺激诱导慢性感染，结果导致新生的炎性细胞在局部浸润。这些细胞如同其附近的内皮细胞，可以释放出 TNF-α，进一步激活上皮细胞 NF-κB 信号通路，最终导致更多的 TNF-α、抗凋亡蛋白（Bcl-X_L、IAP-1 和 IAP -2）和促有丝分裂蛋白（Myc，cyclin D1）的产生。其作用机制如同 COX-2，COX-2 所诱导的前列腺素可以产生多种肿瘤表型，包括接触抑制丧失、细胞增殖速度的增加以及停泊依赖性生长增加。皮肤恶性肿瘤启动因子 TPA 通过激活 PKC-α 而参与此信号通路。除此之外，TPA 能激活 PKC-α，通过 Fos、Jun 和 AP-1 转录因子诱导有丝分裂信号。总而言之，炎症细胞的作用及 TPA 所产生的表型与各种癌基因诱导产生的表型具有相似性，导致初始细胞克隆性增殖，最终导致子代细胞获得附加突变等位基因。

图 11.41 中提出了另一个肿瘤启动的观点。通过前列腺素作为参照的很多细胞表型与通过癌基因作为参照的细胞表型具有惊人的相似性。如杂合性缺失，同非停泊依赖性生长一样，都具有促进细胞增殖的能力。实际上，癌变启动可以创造一个癌基因作用的**拟表型**，即一种类似癌基因作用所导致的生物学特性。

由此可见癌变启动机制可以与癌基因的作用结合起来共同作用于肿瘤的发生。因此，早期的肿瘤细胞可能依靠这种共同作用的形式发展，当其后代获得附加的癌基因作用后，这种协同作用才消失。此时的肿瘤已经获得独立增殖与生存的能力。

11.17 肿瘤启动决定了肿瘤进展的速度

肿瘤的启动过程中存在大量的启动因子（表 11.3），它们具有共同的能力启动早期克隆性增殖。它们在多阶段致癌过程中的机制可以在图 11.12、图 11.17 和图 11.18 中所描述的克隆演变模型中找到答案。为了使初始细胞获得一个附加的突变，首先它的同源后代数量要多，其次发生突变的可能性小，这样才能促使一个或另一个细胞克隆增生。没有这样的克隆增生，下一次的突变将不可能导致单一的子代细胞突变，而使肿瘤进展停止。

表 11.3 人类肿瘤启动因子及其作用位点

因素或过程	肿瘤位置	因素或过程	肿瘤位置
激素类		化学因子	
雌激素	子宫内膜	槟榔，石灰	口腔
雌激素和黄体激素	乳腺	烟草	口腔
排卵	卵巢	胆汁	小肠
睾丸酮	前列腺	盐	胃
药物类		酸返流	食管
口服避孕药	肝	物理或机械性创伤	
镇痛药	肾盂	石棉	间皮，肺
利尿剂	肾	胆道结石	胆囊
传染性因素		粗粮	胃
肝炎病毒 B/C-血吸虫	肝	头部损伤	脑膜
埃及血吸虫-血吸虫	膀胱	慢性刺激/炎症	
睾吸虫-肝吸虫	结肠	热带性溃疡病	皮肤
幽门螺旋杆菌-细菌	胆管	慢性溃疡性结肠炎	结肠
疟原虫感染	胃	慢性膀胱炎	膀胱
结核分枝杆菌	B 细胞	慢性胰腺炎	胰腺

各种各样的肿瘤启动机制都会促进肿瘤进展向以下三条途径发展。第一，启动因子可能诱导克隆性生长，使得大细胞群体的不可能事件转变为可能；第二，细胞增殖需要 DNA 复制，而在 DNA 复制的过程中经常出现 DNA 序列的突变，而反复的细胞分裂也可能给细胞内基因组造成损伤，有丝分裂重组和错误的染色体分离则会导致抑癌基因杂合性缺失（LOH）的发生，进而促进肿瘤的进展；第三，反复的增殖和分裂可能导致干细胞中末端着丝粒的染色体 DNA 的缩短。随后，端粒缩短和融合桥周期破坏进一步导致染色体核型紊乱并产生突变。正如 10.10 节所讲到的，融合桥周期发生功能性缺失可能直接导致癌症发病率的上升。

事实上，有一类肿瘤启动因子，包括炎症，可能在肿瘤进展过程中产生一些附加的效应。如炎症细胞进入组织后释放一种活性氧物质（ROS），它们可能导致其周围上皮

细胞 DNA 发生突变，增加一种内源性的诱变效应。

综上所述，各种不同的研究结果显示致癌物的作用机制被简化了，这些是我们以前在 Bruce Ames 经筛选方法得出的结论。现在很明确，很多致癌物质的作用机制并不是直接的损伤 DNA。正如我们所提到过的，非诱变因子不能通过 Ames 试验检测出来，这就意味着 Ames 试验中一个阳性的结果说明化学试剂的遗传毒性可以预测它们在啮齿类和人类致癌的能力。然而，一个阴性结果也并不能排除非遗传毒性肿瘤诱变剂在肿瘤形成过程中的作用。

一些致癌剂如前面提到的苯并芘（BP），作为一种单独的因素反复应用到动物实验能够诱导肿瘤的形成。这些因素既具有启动因子的作用又具有促进因子的作用，因此被称为**完全致癌物**。这些化学致癌剂在人类肿瘤致癌过程中只起到很小一部分作用。大多数遗传毒性致癌物进入人体后由于其浓度太低，所以很难刺激机体产生细胞毒性效应。因此，由这些因子刺激产生的肿瘤主要依赖于它们是否是一种特异性的肿瘤启动因子。

11.18 总结与展望

遗传改变是驱动肿瘤进展的重要因素，原则上所有的突变都可以追踪到特定的诱变因素。然而，随着我们对多步骤癌变讨论的不断深入，普遍认同的共识是其他物质在人类肿瘤病致病制中也有重要作用。更确切地说，诱变剂在驱动肿瘤进展过程中似乎起到了同等重要的作用，至少在很多肿瘤中都是如此。这一认识是把双刃剑，同时“肯定”并“否定”了我们试图探索恶性肿瘤根源所做出的努力。

例如，有可能大部分致癌剂是肿瘤促进剂（而非起始剂），或者说很多类型的人类肿瘤是在完全没有外源性遗传毒理的作用下发生的，即没有来自体外的致突变剂。在这些肿瘤中，遗传损伤需要以一种完全内源性的方式产生。

这种推测来自于以下两方面考虑。首先，大多数人类肿瘤的起源与诱变剂并无直接关系。主要的原因是烟草和经高温烹饪后的食物所释放出来的燃烧产物（见第 12 章）。

其二，据估计，单个人体细胞每天都要进行 10 000 个化学修饰。这些修饰主要来自各种代谢反应内源生成的化学物质。其中值得注意的是数种类型的活性氧化合物，它们是线粒体氧化代谢的副产物。

很明显，大部分化学损伤都可以被多数细胞中高效的 DNA 修复系统去除（第 12 章）。然而，其中一些损伤逃脱了检测和随后的修复，固定存在于它们最初形成的细胞的基因组中。这些损伤以突变的形式传递到子代细胞。在大多数人类组织中，内源性突变的数目很可能远远多于外源性突变。

这一信息使我们可以形成以下的观点：在内源性的突变等位基因和外源性促癌因素共同驱动下，很多肿瘤细胞逐渐进展为临床上可见的病理学形态。这些外源性的促癌因素包括食物、感染以及包含多种促癌剂的烟雾。如果是这样的话，那么在大多数肿瘤中寻找作为致病因子的外源性致突变剂将难以获得明确的结论。

这些促癌剂的存在使得设计基于实验室的人类致癌物的筛选变得相当复杂。一方面，经常使用的体外致突变性检测，如 Ames 检测，有可能给我们错误的信息，因为这

一方法无法检测促癌剂的存在。另一方面，如果检测方法使用不当，实验室筛选的某些候选人类致癌物将被认为是促癌剂，尽管这一点与实验不符（信息栏 11.15）。

信息栏 11.15　致癌物质对啮齿类动物的作用是否对人类也造成同样的危害　Bruce Ames的沙门氏杆菌实验对我们研究潜在的人类癌症带来了深远的影响（2.9 节），同时也对当前大量实验室化学致癌物的研究意义提出了质疑。这些实验主要包括将兔和小鼠长时间置于高剂量的化学因素暴露，然后通过组织病理学来检查可能发生的肿瘤。

很多这样的啮齿类动物实验侧重于最大耐受剂量的研究，一旦超出这个最大剂量（MTD）范围，将导致动物体内产生明显的组织器官损伤，从而对动物健康产生明显的影响。这些 MTD 研究通常包括高浓度致癌剂暴露，而这种暴露剂量高于人类所能接触的剂量。例如，将人类暴露于杂环胺类试剂，正如在高温环境下煮食物，估计每天 1μg/kg，尽管大多数实验动物研究依据每天 10mg/kg 的剂量，比人体所暴露的剂量大 10 000 倍。在这一种高剂量水平进行研究的目的主要是希望在所有的数百个实验动物中检测其生物学影响，而这种检测只可能在 100 万数量的人类中进行研究才能达到同样的效果。

Ames 认为最大耐受剂量研究过程中使用化合物检测可以更好地发挥其效果。将特殊组织中的细胞杀死，从而引起组织细胞额外的代偿性增殖。因此，将接近 MTD 浓度的化合物导入啮齿类动物后，这种化合物则作为组织特异性促有丝分裂剂促进肿瘤的启动。同时，这种化合物也可能具有诱变剂的功能（11.13 节）。另外，某些化学试剂检测可能导致炎症的发生，反复的炎症刺激也可能促进肿瘤进展。

天然的或合成的化学试剂所产生的毒性和随后的促有丝分裂作用通常在某一阈值剂量以上，低于这一阈值剂量的影响则很难被检测到。因此，诱变剂主要导致基因组突变，并且这种作用与剂量存在明显的线性关系。而化合物的作用与诱变剂不一样，它们的作用类似于促癌剂，并且与剂量没有线性关系（图 11.42）。如果人类暴露于某一化合物环境的剂量低于这种化合物 MTD 千倍以上，并且如果将致癌物质对的啮齿类动物的影响在肿瘤启动过程中发挥更重要的作用时，那么这种高剂量的啮齿类动物测试的结果对于研究人类健康风险的来说就没有任何意义了。Ames 对于致癌物 MTD 研究的质疑仍然存在争议，这个问题有待进一步研究。

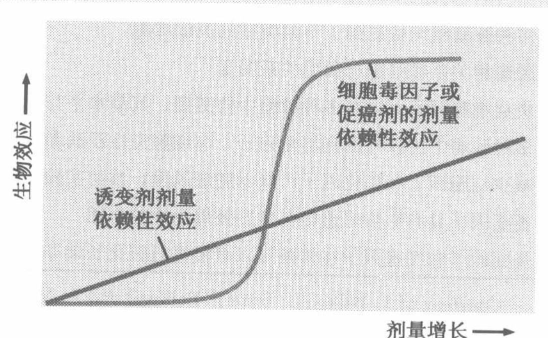


图 11.42　遗传毒性和非遗传毒性药物的剂量效应曲线　大多数研究显示诱变剂的剂量与其带来的突变负荷呈线性比例关系。换句话说，肿瘤发生的风险与诱变剂所带来的负荷呈线性关系。例如，增加 1%全剂量的肿瘤诱变剂（红线）可能导致肿瘤发生风险上升 1%水平。相反，很多促癌剂包括细胞毒性因子的作用机制是相反的（蓝线）。由于诱变剂的效应依赖于启动子与靶蛋白结合的亲和力，因此其产生的生物学效应在图中呈“S”形。在这种剂量效应作用下，当诱变剂浓度显著降低至某一阈值时，其生物学效应是很难产生的；相反，当诱变剂浓度显著升高至某一阈值时，其产生的生物学效应则达到最大值。

这些观点意味着关于肿瘤起始及进展的激烈争论具有广泛的公共卫生意义。对致癌等生物学过程的误解将导致我们对应该摄入和应该避免摄入的物质谱产生巨大的影响（信息栏 11.16）。

信息栏 11.16　糖精能致癌吗　科学界关于化学物质的致癌作用已经争论了大约 40 年。1970 年，研究人员发现将糖精颗粒植入雄性小鼠膀胱可以导致小鼠膀胱癌的发病率显著增加。这一结果在当时引起了世界范围内肥胖患者和糖尿病患者极大的恐慌，因为他们的饮食中包含了大量可能致癌的人工合成甜味品。

各种关于糖精致癌的证据看上去非常奇特。在 Ames 的研究中，糖精并不是作为一种诱变剂。确实，糖精离子在溶液中带负电荷，并且与 DNA 结合的亲和力很低。除此之外，致癌物产生的影响远远晚于糖精颗粒排出体外的时间，并在胆固醇的形成之后。以上证据表明，这些颗粒对膀胱壁造成的机械性刺激也对肿瘤发生产生一定的影响。当糖精的含量占总饮食的 2.5%～5.0%时，才能在成年家兔体内检测到肿瘤（这相当于正常人类每天喝 750 杯咖啡的量，而每杯咖啡加入一片糖精）。膀胱癌在其他哺乳动物体内很少发现，包括摄入有效剂量长达 20 年的猴子。而小鼠饮食中也包含 7.5%的糖精，但是膀胱癌的发生却很少见。

雄性家兔所排泄的尿液中包含一种称为"主要尿蛋白"（MUP）的蛋白，其浓缩倍数比人类高 100～1000 倍，它们与糖精离子结合而形成共沉淀物和结晶体，并在雄性家兔膀胱内进一步浓缩聚集。这些沉淀物刺激雄性家兔膀胱上皮细胞并促进膀胱肿瘤的形成。

啮齿类动物模型中类似的研究也显示了糖精致癌性的危害，但各种研究却产生了较大的分歧，即糖精是否是完全无害的。这种争论持续了 30 年，现在仍然没有流行病学证据证明食用大量糖精能增加人类膀胱癌的发病风险（人工香料在加拿大和加利福尼亚仍然是被禁用的）。因此可见，肿瘤的启动是很奇特和复杂的工作，并且种间比较分析存在着很大的风险。

对慢性炎症和感染是促进肿瘤启动的两种重要因素的认识对于降低癌症发生率有着深远的意义（表 11.4）。炎症可以通过抗炎药物得到控制（如 NSAIDS），并且在不远的将来我们很有希望开发出不具有副作用的抗炎药物。

表 11.4　炎症与肿瘤发病机制的关系

许多炎性条件能诱导肿瘤产生
癌起源于慢性炎症部位
细胞因子功能多态性和受损程度相关
多种肿瘤组织检测到了不同类型的炎症细胞
肿瘤相关巨噬细胞与预后关系明显
炎症细胞因子可以在多种肿瘤中检测到，其高水平与患者预后不良相关
多种肿瘤中可以检测到趋化因子，与细胞炎性浸润和细胞迁移相关
减少细胞因子和趋化因子可降低肿瘤风险，预防实验性转移和淋巴结增生综合征
炎症因子具有影响非遗传毒性肝致癌物质的作用
炎症因子和细胞因子在体外可以直接进行转化长期非甾体抗炎药的使用降低了结肠癌的死亡率

Courtesy of F. Balkwill; from F. Balkwill and A. Mantovani, Lancet 357: 539-545, 2001.

据估计，全世界 9%的癌性死亡是由于胃幽门螺旋杆菌感染，并最终导致胃癌的发生而产生的；6%的癌性死亡是由于 HBV 和 HCV 慢性感染引起的相关性肝癌。HPV 导致的宫颈上皮慢性感染（主要是 16、18 和 45 型）在部分女性中最终发展为宫颈癌，这占全世界癌性死亡的 5%（在后一种情况，病毒感染的慢性炎症作用和两个 HPV 源性癌基因 *E6* 和 *E7* 的共同作用有关）。虽然这些数字很令人沮丧，但是它们提供了减少全世界癌症发生率和死亡率的巨大机会：与我们所摄入的食物和吸入的烟雾相比，感染性疾病更加容易控制和预防（通过免疫）。据估计，全世界有 4.5 亿人为慢性乙肝感染

者，而 2 亿人为长期 HCV 携带者。这些数字提示了预防这些病毒性疾病可能为人类带来巨大的益处。

炎症过程被证实参与了很多非病毒性肿瘤。在这些情况中，未来研制抗癌药的机会将来源于最近关于炎症生化细节和炎症在肿瘤中特定作用的进展。很明显，COX-2 处于这个过程的中心。针对靶向 COX-2 的抗炎药物（如 NSAID）在降低各种肿瘤发生率方面被认为有效。然而，不幸的是这些药物的长期使用可以在某些个体诱导无法接受的副作用，包括致死性心血管并发症。我们推测这些副作用是由于 COX-2 可以产生一系列不同的前列腺素，而这些前列腺素又可以引发很多下游细胞反应。

然而，抗癌药物的研发前景是光明的，这些药物通过影响 COX-2 信号通路起到预防性和治疗性作用，同时可以避免由于长期使用 NSAID 所产生的副作用。因此，COX-2 促进肿瘤作用的主要中间产物前列腺素 E2 被证实至少可以结合并激活 8 种细胞表面受体（见 5.7 节和 6.11 节），而每个受体可激活其特定下游反应。相应地，通过抑制某个受体，研发具有高度特异性的药物，有助于生产具有降低炎症相关肿瘤发生并且产生极少的广谱 COX-2 拮抗剂相关副作用的药物。

雌激素、前列腺素和雄激素在人类肿瘤讨论中占一席之地，因为它们在乳腺癌、子宫内膜癌和前列腺癌的发生和发展过程中起关键作用。这类肿瘤在西方肿瘤死亡率中占 9%。这些激素通过刺激相应靶组织上皮细胞而促进其增殖，因此我们可以很容易地将它们整合到肿瘤起始和促进的概念中。另一个全身性激素——IGF-1（胰岛素样生长因子 1）似乎也可以作为一种重要的促癌剂（见补充材料 13 ◎），因为它可以避免恶性细胞发生凋亡，促进其增殖。

重要的是，这些激素在肿瘤形成后仍然起着重要作用。在很多已建立的乳腺癌和几乎所有前列腺肿瘤中癌细胞的增殖都各依赖于雌激素和雄激素的持续存在。很多肿瘤形成后似乎还需要 IGF-1 的持续刺激。由此提出了研究人员较少涉及的一个问题：恶性肿瘤一旦形成后多大程度上还依赖于一开始的促癌剂？

我们可以提出一个不同但相关的问题：成熟的肿瘤还需要起始致癌剂导致的突变等位基因吗？或者肿瘤进展初始步骤中的这些早期突变随后变得不重要，因为随后获得的其他突变开始诱导肿瘤细胞的增殖？

这一问题最直接的答案来自肿瘤进展小鼠模型的实验，特别是转基因小鼠。某些癌基因被组织特异性激活；这些基因的活化最终导致这些组织中肿瘤的发生。在某些小鼠模型中，初始的转基因，如 *myc* 和 *ras*，在实体肿瘤形成后通过各种实验手段将其失活。到目前为止，研究人员观察到的对肿瘤生长的作用是不一致的。

通常，在清除了最初导致肿瘤形成的癌基因后这些肿瘤将迅速地萎缩。因此，在这些情况中，突变的等位基因在肿瘤起始和肿瘤维持中都是起重要作用的。换言之，多步骤癌变随后累积的突变基因并不代表原先的突变是不必要的。然而，在许多研究报道中，在抑制了初始的 neu、myc 或者 writ 癌基因后，肿瘤组织的生长在短暂的缓和后重新开始加速。在这些例子中，初始的癌基因在复发肿瘤的增殖中不再是必要条件了。

现在，我们可以假设这些小鼠肿瘤形成的模型也反映了人体内肿瘤形成的机制。如果是这样的话，关闭初始癌基因观察到的效应对研发新类型的抗癌药有重大意义。这我们将在第 16 章讨论。例如，如果我们在人类肿瘤细胞基因组中发现 *ras* 等位基因，那

么靶向 Ras 癌蛋白的药物能否治愈这个肿瘤？或者这个曾经在肿瘤形成中起关键作用的癌蛋白随后已经与肿瘤细胞的持续增殖和生存毫不相关了？

人类肿瘤细胞基因组中存在的大量遗传改变使当今癌症研究的一个主要目标变得非常的复杂：描述各种人类肿瘤的“遗传图谱”——编码细胞肿瘤表型遗传改变的演变。在大多数人类肿瘤细胞中，DNA 序列改变的数目远远多于驱动肿瘤进展的具有因果关系的遗传改变（及启动子甲基化）。目前，我们仅有相当初步的工具来识别真伪——鉴别肿瘤细胞中存在的少数生物学上重要的遗传改变和多数功能上不相关的遗传改变。

尽管我们面对这些难以回答的问题，我们仍然可以乐观地相信我们很快就能够阐述一些能将各种类型人类肿瘤置于一个共同的概念框架下的基本原则。一旦这样的原则很好地确立了，我们就能够用它们来解释为什么不同的人类肿瘤会具有某些特定的突变基因（和甲基化）的组合。对不同人类肿瘤生物表型的研究导致我们有这样的认识：所有的高度进展的人类肿瘤细胞具有一些共同的基本特性，这些特性是它们在通向癌变之路上获得的。这些共同特性有：①对外源促有丝分裂因子依赖型减少（第 5 章、第 6 章）；②获得对生长抑制信号的抵抗性，如 TGF-β（第 8 章）；③无限分裂的能力，即永生化（第 10 章）；④对凋亡的敏感性下降（第 9 章）；⑤产生新血管的能力，即血管生成（第 13 章）；⑥获得侵袭性和转移（第 14 章）；⑦逃逸免疫监视的能力——较少报道的（第 15 章）。

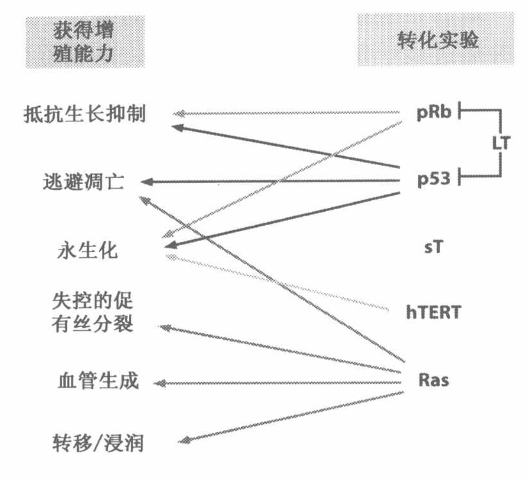
事实上，本章所描述的一些现象主要揭示了另外一个共性。我们关于克隆进化和演变的讨论表明肿瘤干细胞群体的突变率必须异常高才能保证这些事件以合理的频率发生。如果没有累加的突变，在人一生中细胞克隆很难累积肿瘤形成所需的多种遗传改变。总之，这些推测及观察结果汇聚成几乎所有肿瘤都具有的第 8 个属性：获得基因组的不稳定性（第 12 章）。

如果我们相信这 8 条属性，至少是暂时性的，我们需要把每一个属性的获得和多步骤肿瘤进展的特定步骤联系起来。例如，我们可以假设人类肿瘤进展的每一个步骤都需要一个特定基因的改变，这个改变可以是基因突变或者表观遗传的甲基化。此外，我们还可以想象肿瘤进展的每一个步骤产生以上 7 个或 8 个属性之一。这将产生一个“一个基因，一个表型”的现象，这一点有助于简化我们关于人类肿瘤进展的认识。这样的理论是很吸引人的，但是过分简单化了肿瘤进展的过程，因为特定基因改变和细胞表型相应改变之间并不存在一一对应的关系。相反，很多肿瘤表型是通过多个基因或者遗传改变共同作用获得的（图 11.43）。例如，人类肿瘤细胞所展现的凋亡抵抗经常是由于 Ras 信号转导通路（该通路激活抗凋亡的 PKB/Akt 激酶）和 p53 信号转导通路的失活。

反之，某些多效能肿瘤基因的突变可能会使细胞同时具有多个不同的表型优势。因此，*myc* 癌基因的活化会同时下调 pRb 信号通路（此通路使细胞对生长抑制信号反应），解除时 *hTERT* 基因的抑制（促进永生化），并且减少细胞对有丝分裂原的依赖性。显然获得一个简单概念的设想在基因及其编码蛋白如何作用的生物学复杂性面前显得不很乐观。

意识到这个复杂性，我们还可以尝试另一种类型的假设。我们可以想象肿瘤细胞的每一个生物表型都是细胞中某个调控亚通路发生改变的直接结果（图 11.44）。如果是这样的话，我们可以将肿瘤理解为细胞中多个不同亚通路的进行性调控异常。

图 11.43 肿瘤细胞基因型与表型对比 肿瘤进展过程中，人类细胞不断获得了一些不同的癌相关特性。除此之外，实验室研究也证明了以上观点。然而也存在另一个问题，这些引入的基因是如何导致细胞产生具有致瘤性表型的。正如这里显示的，端粒末端转移酶催化亚单位 hTERT 编码基因仅仅只导致细胞产生永生化表型；而其他一些编码基因如 *p53* 可以导致细胞产生至少 3 种不同的表型——抑制细胞生长、逃避细胞凋亡和永生化。而作用最广泛的则是 *ras* 基因所编码的 Ras 蛋白，如影响细胞凋亡易感性、决定外源性有丝分裂剂、参与血管发生以及侵袭能力和转移能力。因此，基因与肿瘤相关表型是不可能产生一一对应的生物学关系的。



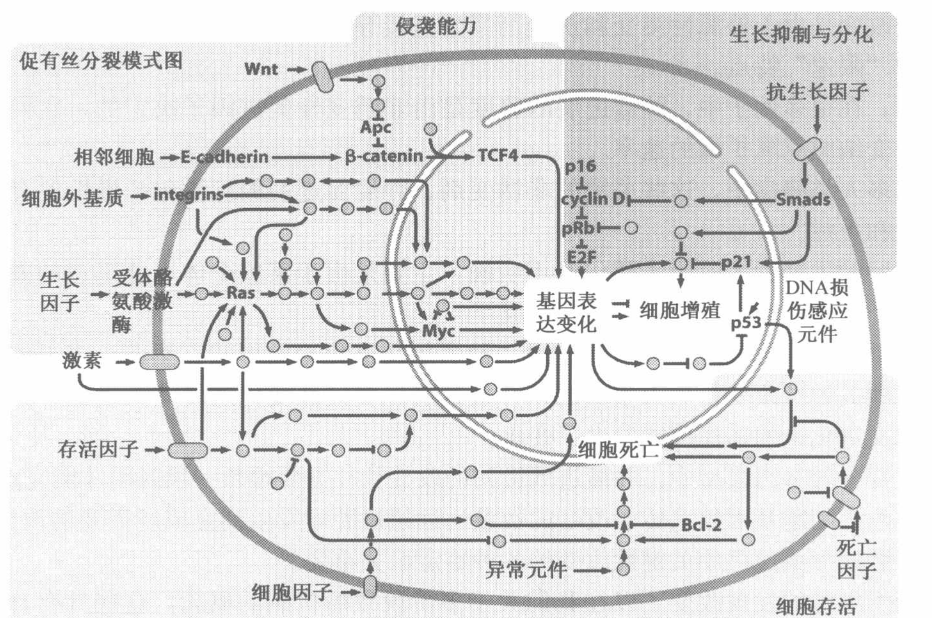


图 11.44 细胞内信号通路癌相关基因的联合作用 仔细观察本图可以使我们获得一些欣慰。例如，有丝分裂原非依赖性的获得主要通过受体酪氨酸激酶的激活（RTIO-Ras-MAPK 通路），而凋亡抵抗性是通过调控程序性细胞死亡的亚通路改变获得的。然而，其他这样的获得性属性也可以归于这个巨大的通路网络的特定部分。尽管如此，因为细胞中各种通路之间存在许多交叉连接，这里仍然没有简洁和简单的区分。另外，数个亚通路往往共同影响一个特定的肿瘤表型。（Adapted from D. Hanahan and R. A. Weinberg，Cell 100：57-70，2000）

尽管存在如此多的限制因素，图 11.44 和其他类似的图可以点燃一个在新世纪前数个十年中可能实现的愿望：在某些程度上，我们能够真正从细节上理解这些通路如何运作并且调节细胞表型的。从而可以对每个通路的运作进行数学建模。这样，我们就能够基于每个调控通路中特定分子缺陷的相互作用将肿瘤细胞行为理性化的看成一个整体。

最后希望通过重温肿瘤细胞的第 8 个属性来结束本章——基因组不稳定的获得。鉴于肿瘤进展中每个步骤的低概率，完成整个过程变得极端不可能。但是，肿瘤在人群中以一个相当高的频率发生。下一章将集中讨论如何解决这一难题，并揭示一个在数学上不可能阐述的疾病过程，即一个常见的、占人类死亡率 20%的病因。

重要概念

- 肿瘤的形成是一个复杂的多阶段过程，包括复杂的细胞改变和生理学控制机制。这种复杂的过程反映出大多数人类恶性肿瘤的形成需要经历很长一段时间。
- 这些改变包括癌基因的激活和抑癌基因的失活。
- 实验室转化人类细胞比实验室转化小鼠所需要的步骤更多。
- 这些改变影响了细胞中复杂而又各不相同的调控周期和产生恶性细胞表型的相关功能。
- 有些改变是由于外源性突变和诱变剂暴露直接导致的，它们可以反映出肿瘤进展过程的“限速”特点。
- 然而，在很多例子中，肿瘤进展的速度是由非诱变性促进因子决定的，它们主要决定突变细胞克隆扩增的速率。
- 在很多人类癌症中，这些关键的非诱变剂、肿瘤促进剂的刺激包括慢性促有丝分裂刺激和炎症。
- 人类肿瘤进展的多阶段步骤仍然不明确，主要是由于某些个体可能迅速的发病，而其他个体可能需要很长一段时间完成。
- 肿瘤进展的多阶段步骤可以描述成一种达尔文进化论的形式。然而，由于致瘤过程中某些关键性改变是后天生成的，并且其遗传多样性变化速度非常迅速，因此这种达尔文进化论的描述可能发生了变化。
- 在大部分转基因模型中，肿瘤进展最初的改变往往需要很长一段时间才能完成。
- 人类癌症细胞基因组遗传学改变的数量远远超过肿瘤发生到完成所需要的改变数量。对于肿瘤形成过程中关键性改变的各种鉴定至关重要。
- 肿瘤干细胞的发现改变了以往我们关于多阶段致瘤机制的概念，这些具有自我更新能力的细胞可能是遗传改变和克隆选择的主体。

思考问题

1. 我们知道肿瘤进展的多阶段过程中存在各种各样的遗传学和后生渐成改变，你认为哪种改变更容易被揭示？而哪种改变则更难被鉴定？叙述一下你的理由。
2. 多阶段致瘤过程中一些抑癌基因的失活可以通过 LOH 进行鉴定，而其他一些抑癌基因的失活却很难通过 LOH 来进行鉴定。请叙述一下决定这种鉴定方式可行性的因素。
3. 对于机体早期前癌细胞大量克隆的概念，请给出你的观点。
4. 对于大量致癌物质作为人类肿瘤的促进剂，而不是肿瘤发生的启动因子的概念，给出你的观点。
5. 存在哪些不同的方法来估计多阶段致瘤步骤的数量？这些方法又存在哪些缺点？

6. 如何将现有的多阶段致瘤假说知识运用到临床上预防肿瘤的发生中？

7. 慢性病毒感染导致组织产生致瘤性的机制是什么？

8. 描述一下肿瘤促进的各种不同的作用机制以及有别于其他组织的共同特点。

参考读物

Adams JM & Cory S (1992) Oncogene co-operation in leukaemogenesis. *Cancer Surveys* 15, *Oncogenes in the Development of Leukaemia*, 119–141.

Aggarwal BB (2004) Nuclear factor-κB. The enemy within. *Cancer Cell* 6, 203–208.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3983–3988.

Al-Hajj M & Clarke ME (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23:7274–7282.

Armitage P & Doll R (1954) The age distribution of cancer and a multistage theory of carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 8, 1–12.

Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* 4, 540–550.

Boland CR & Ricciardiello L (1999) How many mutations does it take to make a tumor? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14675–14677.

Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA et al (2003) A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 63, 1727–1730.

Buendia MA (1992) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Adv. Cancer Res.* 59, 167–226.

Cairns J (1975) Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature* 255, 197–200.

Clevers H (2004) At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 118,671–674.

Cohen SM & Ellwein LB (1990) Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249, 1007–1011.

Coussens LM & Werb Z (2001) Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.* 193, F23–F26.

Coussens LM & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.

Dick JE (2003) Breast cancer stem cells revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3547–3549.

Glick AB & Yuspa SH (2005) Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin. Cancer Biol.* 15, 75–83.

Gold LS, Ames BN & Slone TH (2002) Misconceptions about the causes of cancer. In Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice (D Paustenbach ed), pp 1415–1460. New York: John Wiley & Sons.

Grady WM & Markowitz SD (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 101–128.

Gupta RA & DuBois RN (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1, 11–19.

Hahn WC & Weinberg RA (2002) Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* 347, 1593–1603.

Hahn WC & Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 331–341.

Hanahan D (1989) Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 246, 1265–1275.

Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hansel DE, Kern SE & Hruban RH (2003) Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4, 237–256.

Henderson BE & Feigelson HS (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427–433.

Hunter T (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249–270.

Huntly BJP & Gilliland DG (2004) Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell* 6, 199–201.

Hussain SP, Hofseth LJ & Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 276–285.

Janssens V, Goris J & Van Hoof C (2005) PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 34–41.

Kelly LM & Gilliland DG 2002 Genetics of myeloid leukemias *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 179–198.

Kern S , Hruban RH, Hidalgo M & Yeo CJ (2002) An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer Biol. Therapy* 1, 607–613.

Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 157–162.

Marx J. (2003) Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 301, 1308–1310.

Miller EC (1978) Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Res.* 38, 1479–1496.

Moore MA & Tsuda H (1998) Chronically elevated proliferation as a risk factor for neoplasia. *Eur. J. Cancer Prev.* 7, 353–385.

Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

Pardal R, Clarke MF & Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 895–902.

Parsonnet J (ed) (1999) Microbes and Malignancy: Infection as a Cause of Human Cancers. Oxford, UK: Oxford University Press, New York.

Renan MJ (1997) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinogenesis* 7, 139–146.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF & Weissman IL (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.

Thun MJ, Henley SJ & Calle EE (2002) Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. *Oncogene* 21, 7307–7325.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.

Vogelstein B & Kinzler KW (eds) (1998) The Genetic Basis of Human Cancer. New York: McGraw-Hill.

Yuspa SH (1994) The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 54, 1178–1189.

Zha S (2004) Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 215, 1–20.

Zhao JJ, Roberts TM & Hahn WC (2004) Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol. Med.* 10, 344–350.

zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254, 1167–1173.

（吕有勇　严　志　郭瑞芳）

第 12 章　基因组完整性的维持及肿瘤的发生与发展

当第一次解释 DNA 和遗传密码的区别时……我们完全忽略了修复酶可能的功能……后来我才意识到 DNA 是如此宝贵，极有可能存在多种不同的修复机制。

Francis H. C. Crick，分子生物学家，1974 年

有能力发生细微的错误是 DNA 真正的惊人之处。如果没有这一特征，我们将仍是厌氧细菌，更不会有音乐的诞生。

Lewis Thomas，生物学家，1979 年

人类肿瘤的形成是一个极其复杂的、多阶段的过程，这反映了人体细胞中已经建立了防御肿瘤的多重防线，并且每道防线均通过复杂的调节网络来维持。人体，实际上是其单个细胞，必须依赖于这些抗肿瘤防线的维持来保护最稳定的组分——DNA 分子。随着时间的推移，DNA 序列始终是细胞中最稳定的、不变的成分，而细胞中其他部分则处于不断更新中，不断地被产生和降解。

根据这一逻辑，正是 DNA 分子的稳定性加固了其作为最有力的抗癌防线的基础。因为多道防线依赖于 DNA 的稳定性，并且每道防线的突破通常需要一次罕见的突变事件，因此细胞群体发展至肿瘤阶段的可能性是非常小的。

细胞和组织中的多重防御机制不断进化，保护我们远离肿瘤，所以我们可以高枕无忧。但这里有一处矛盾：如果肿瘤防御机制的数目的确像文中描述的一样巨大，如果突破每道防线都依赖于稀有突变事件，那么癌症应该不会在人群中发生。但是，癌症的确发生了。在传染性疾病导致死亡相对少见的西方人群中，大概 1/5 的人死于各种形式的肿瘤。因此，肿瘤细胞完成了似乎不可能完成的事：经过数十年时间，肿瘤细胞获得了大量突变（和甲基化）的等位基因。

早在 1974 年华盛顿西雅图的研究者就试图解决这种矛盾，他们提出解决这种逻辑困境的唯一途径依赖于突变率的剧增：正在恶化的细胞相对于正常人类细胞必定具有更容易突变的基因组，这种情况有时被称为增变表型。最近这种推测得到了越来越多的支持，因为不同形式的遗传不稳定性已经在肿瘤细胞基因组中得到证实。

本章中，我们将重点关注两个重要问题：第一，正常细胞和组织如何保持如此低水平的突变率？第二，人类肿瘤发病时如何使抑制突变的机制受阻？

12.1　各种人体组织的严密结构使突变积累最小化

在本文中的多处，我们讲述了致癌物和肿瘤促进剂对人体靶细胞的作用。然而，这

些靶细胞的特异生物学特征尚不清楚。因此，掌握这些细胞的特征对于理解如何维持基因组完整性是非常关键的。为了探索这个问题，我们需要深入研究组织的构建及构成组织的各种细胞，了解它们的生物学行为将有助于我们了解组织和细胞将遗传损伤累积降至最低的策略。

正如前面所提到的（11.6 节），有一种共同的模式解释人体中多种组织的构建及维持。每种组织中都有少量的一部分细胞处于干细胞区域。这些自我更新的细胞可能构成了组织中所有细胞群体的很小一部分，有时仅仅占到全部细胞的 0.1%～1%。其实，在大多数组织中，这些数字只是粗略的猜测。由于干细胞数目很少，外形不容易鉴别，并经常分散在组织的其他细胞类型中，所以它们很难被识别和研究。因此，下面大多数关于干细胞的描述是推测，而不是对干细胞及其特征的直接观察。

我们将简单回顾一下第 11 章关于干细胞的讨论。下面我们主要集中讨论的是组织中正常的干细胞，而不是肿瘤中的肿瘤干细胞。与肿瘤组织中的一样，正常组织中的干细胞具有自我更新能力，因为一个干细胞分化成的两个子细胞，至少其中之一将保留母细胞分裂前的表型。在多种组织中，第二子细胞及其过渡-扩增细胞将通过一系列的细胞分裂才进入到有丝分裂后高度分化的状态。这些活跃的分裂细胞充当干细胞及其分化后代之间的媒介物，可能会再产生数十、甚至数百的第二子细胞的分化后代（图 12.1）。

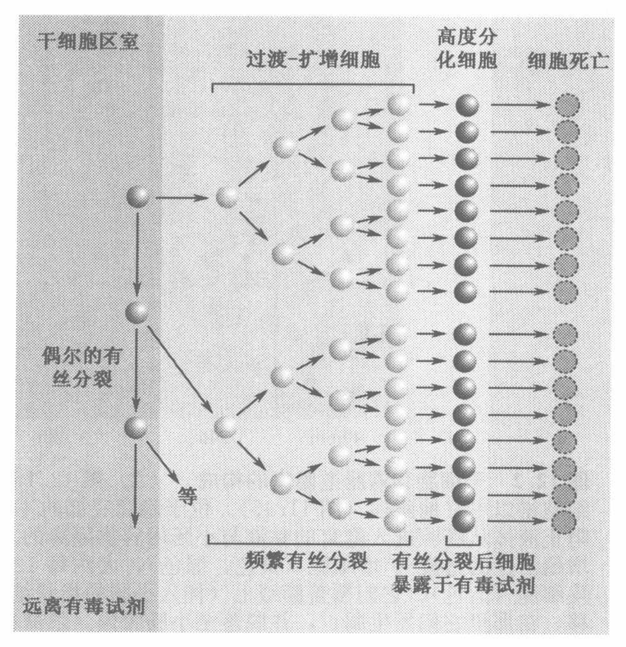


图 12.1　组织形成和干细胞基因组的保护　许多上皮组织的组建与这里展示的模式一致。如图所示，每个干细胞（蓝色）偶尔发生不对称分裂，产生一个新的干细胞和一个过渡-扩增子细胞。这些干细胞常常在解剖学上远离有毒物质。过渡-扩增子细胞（绿色）经过多轮的生长和分裂，以指数形式增长。最终，这些分裂的产物进一步分化成有丝分裂后的、高分化的细胞（红色）。这些高度分化的细胞经常与多种有毒物质直接接触，并以一定频率脱落。因此，来源于这些细胞中的任何突变等位基因最终都会从组织中丢失。这意味着干细胞的基因组通过两种机制进行受到保护：①干细胞很少分裂；②它们在解剖学上远离有毒的、可能导致突变的影响。

过渡-扩增细胞数目的指数级增长意味着一个干细胞只需偶尔分裂就可以维持组织中大量的终末、高度分化的细胞。因此，尽管人们可能认为是干细胞参与连续的细胞生长和分裂周期，但事实常常并非如此：在很多组织中，具有较高有丝分裂活性的实际上是过渡-扩增细胞。因为每个细胞周期中的 DNA 复制原本就倾向于产生错误，这种模式将减少组织干细胞基因组中累积突变的风险。

在许多上皮组织中，分化的上皮细胞尤其容易受到损伤，因为它们形成各种管腔的内壁，这些管腔里含有众多有毒物质。结肠和胆管的上皮细胞分别接触着排泄物和具有

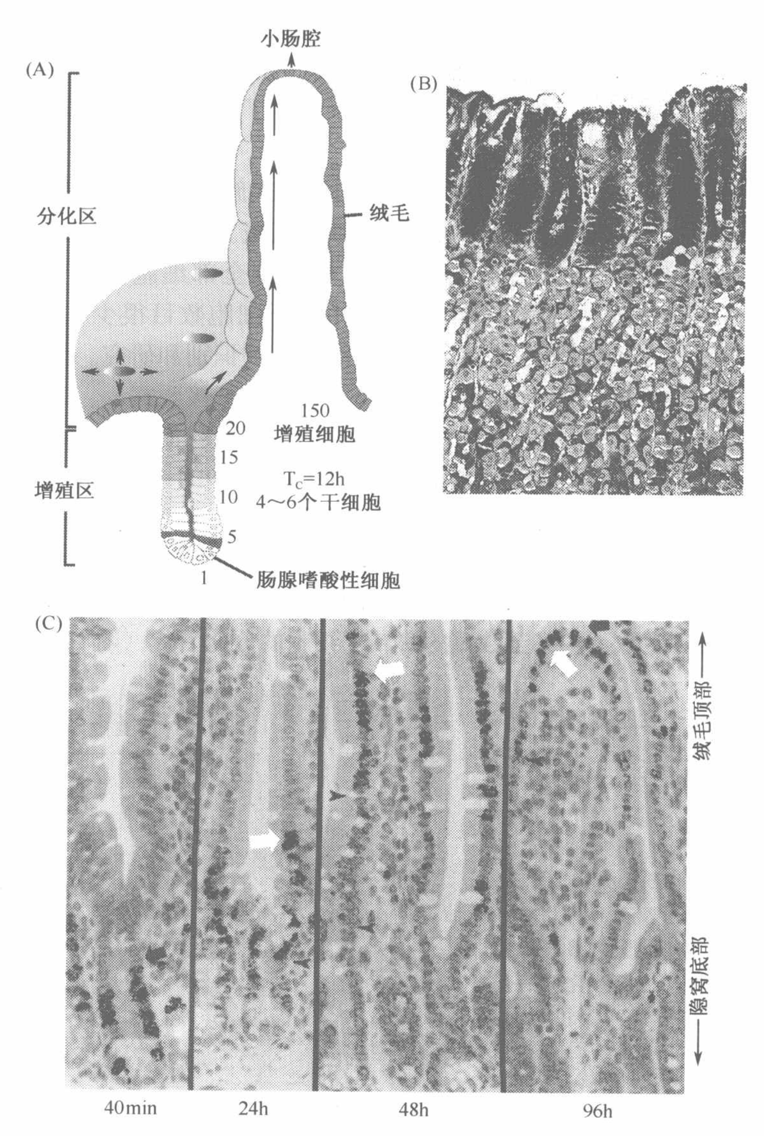


图 12.2　干细胞和胃肠道隐窝的构成　（A）图 12.1 所示的组织构建可以通过小肠内的肠上皮细胞得以更好地阐述（图 11.15）。位于隐窝底部的 4～6 个干细胞（红色）是通过所处部位及阻止液体从肠腔进入隐窝的黏液与小肠内容物隔离的。干细胞孵化出大量（约 150）具有高度增殖活性的过渡-扩增细胞（黄色，绿色），大约每 12h 分裂一次。分裂得到大约 3500 个肠上皮细胞（蓝色），它们覆盖肠绒毛（伸入小肠的指状结构）。肠上皮细胞不断向小肠绒毛顶部迁移，在那里它们发生凋亡，并脱落至小肠腔内。隐窝右侧的数字代表了从隐窝底部算起细胞所处的位置。（B）组成胃壁凹陷的细胞分泌大量保护性的黏液（暗紫色）；在小肠和大肠的隐窝里有高糖基化蛋白（称作黏液素）组成的相似的黏液。（C）从小肠隐窝迁出的过渡-扩增细胞能够通过将^{3}H-胸腺嘧啶核苷注入小鼠体内来示踪，通过放射自显影检测掺入放射标记的 DNA；放射性衰变通过黑色的银颗粒显示，掺入只在很短时间内发生。这里显示的是小鼠十二指肠隐窝细胞在注入^{3}H-胸腺嘧啶核苷后，在规定的时间点检测。一开始注入^{3}H-胸腺嘧啶核苷后只分裂几次的细胞仍保留很强的标记信号（宽箭头），然而大部分细胞标记后会经历多次额外分裂（在 chase 示踪期间），因此其放射性标记会被稀释。4 天后，实验中几乎所有一开始就合成的细胞基因组会被带出隐窝，并被运至小肠绒毛处。（A，courtesy of C. S. Potten；B，from B. Young and J. W. Heath et al.，Wheater's Functional Histology，4th ed. Edinburgh：Churchill Livingstone，2003；C，from C. S. Potten，Phil. Trans. Royal Soc. London B 353：821-830，1998.）

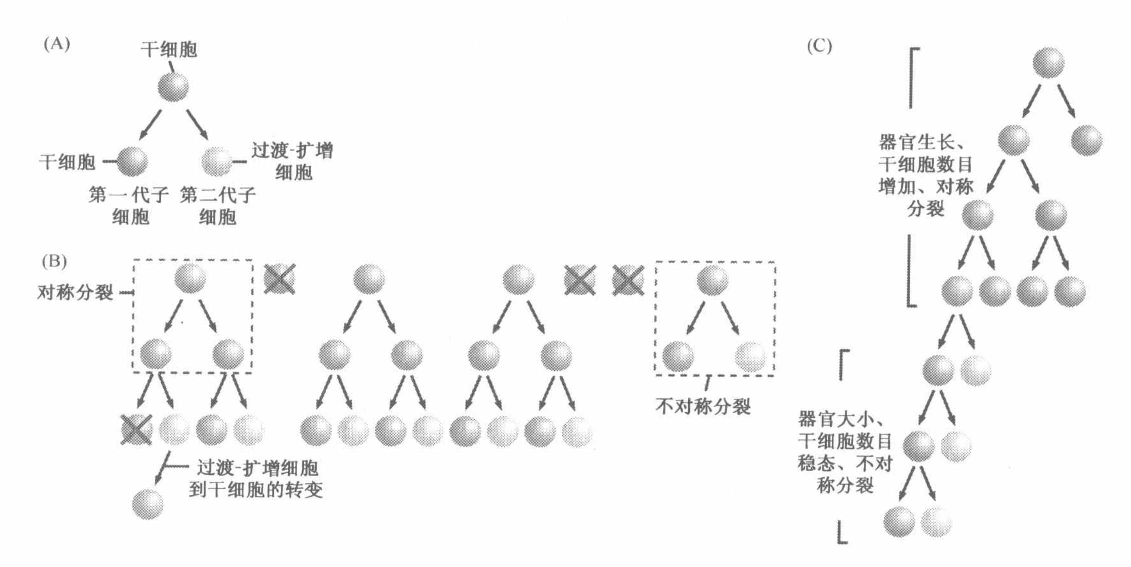


图 12.3 干细胞的对称分裂和不对称分裂 (A) 正常情况下，干细胞的分裂是不对称的，其中一个子细胞仍然是干细胞（蓝色），而另一个子细胞则进一步分裂并发育成过渡-扩增细胞（此图中未显示，参见图 12.1）。(B) 如果组织中丢失了一些干细胞，一些存活下来的干细胞可能通过进行对称分裂以合适数目的细胞重建干细胞库。如图所示，某一干细胞库含有 7 个干细胞，丢失了 3 个（最上排红叉标记的细胞），余下的干细胞随后进行对称分裂，使干细胞库中干细胞数量保持不变。并且，子代中干细胞的丢失（第三排中红叉标记的细胞）会使另外一个过渡-扩增细胞转变成干细胞（底部）。(C) 同样，在器官成长时干细胞的数量要成比例增加，这也需要一些干细胞进行对称分裂。

高度腐蚀性的胆汁。形成肺泡的细胞每天都必须和空气中的颗粒及污染物对抗。我们皮肤的角质化细胞直接暴露于外界，因此更易受到各种损伤，如紫外线辐射的破坏。

在各种组织中终末分化细胞（图 12.1）的寿命是有限的，它们最终都要被丢弃。某些细胞类型在组织中不断地行使活跃的职能从而逐渐变老并失去生存能力。例如，红细胞的平均寿命大概为 120 天，之后脾脏会将它们降解，它们的内含物则进行再循环或被分泌出去。结肠的上皮细胞生存 5～7 天后被诱导发生凋亡，然后脱落进入肠腔中。皮肤的角质化细胞形成后 20～30 天内死亡，以死皮的小鳞片形式不断脱落（如图 2.6A）。

过渡-扩增细胞具有很高的有丝分裂活性，并且它们的分化后代可能经常位于突变的环境中，因此发生突变的风险也很可能随之升高。然而从整体来说，过渡-扩增细胞和其分化后代携带的任何遗传损伤对组织几乎没有影响，因为这些细胞最终会被清除，一旦它们死亡，其所积累的任何突变都将随之消失。

干细胞及子代细胞的动力学大多以干细胞和小肠及结肠的肠细胞（分化的上皮细胞）图解的形式来阐述。关于这些细胞及其行为，我们在讨论肿瘤抑癌基因 APC 和 β-catenin 的章节中做过阐述（7.11 节），下面讨论一下这些细胞的其他方面。前面提到，干细胞深深地嵌入到隐窝中（图 12.2A），通过隐窝中细胞分泌的厚厚的黏液层与肠腔中的突变物质隔离，使它们在那里可以免受损伤。这种黏液（由高度糖基化的被称为黏

蛋白的蛋白构成）产生了胶状的障碍物阻止肠腔中的物质渗入到隐窝中去（图 12.2B）。该现象实际上揭示了降低干细胞基因组突变的另一种策略：进化过程产生了干细胞在解剖学上与毒素，包括致癌物隔离的机制。Muc2 是胃肠道中一种大量存在的黏蛋白，被去除 *Muc2* 基因的小鼠容易发生小肠腺瘤，其中许多会进一步演变成为腺癌。这些赋予了对干细胞基因组进一步的保护，对前面提到的机制是一种补充。在前述的机制中，这些细胞的子代细胞可能含有突变，它们会被清除出隐窝，5～7 天后被排出（图 12.2C）。

理论上，组织中的干细胞区域有无限的能力来产生分化的子代细胞而不被损耗。然而，一个干细胞不可避免地会因为这样那样的不幸从这个细胞区域中消失。这个干细胞队伍中的缺口必须由其他的干细胞来填充。更具体地讲，存活下来的干细胞的两个子代细胞都需要保持母细胞的表型，因此进行了一次均等分裂（图 12.3）。这可能也会为基因组稳定的维持提供一些提示，将在后面的章节中提到。

12.2　干细胞是导致癌变过程致癌作用的潜在靶点

肠细胞的特征（图 12.2）为识别可能成为致癌作用靶点的细胞提供了重要的线索。鉴于高分化的细胞存在时间很短，我们需将注意力转移到生存期长的上皮组织中的细胞和细胞系。实际上，我们已经找到了表明长生存期细胞在癌变过程中主要功能的证据。在第 11.13 节中，我们了解到用于诱导小鼠皮肤癌的实验方案。

其中一种方案为，在皮肤上涂抹一种初始诱变剂，几个月内不要触碰这部分皮肤，然后重复涂抹 TPA（一种有效的皮肤癌促进剂）。暴露于初始诱变剂的细胞一年后对这次作用仍然有记忆，当促进剂存在的条件下，细胞会增殖形成皮肤乳头瘤。正如其他上皮组织一样，皮肤中生存期长的细胞是位于干细胞区域的。

有趣的是，如果小鼠皮肤暴露于初始诱变剂后马上用 5-氟尿嘧啶（5-FU）处理，小鼠皮肤致癌方案诱导的皮肤乳头瘤和癌的数目并不会减少。因为 5-FU 可选择性地杀死分裂活跃的细胞。说明初始阶段的致癌诱变剂靶向的细胞并不是初始阶段活跃分裂的细胞，而是那些偶尔分裂的细胞。

对一些类型白血病进行研究的结果表明，在造血系统中致癌作用的初始靶点也是干细胞。最典型的例子是慢性髓性白血病（CML）。正如前面所提到的，在此病几乎所有病例中都可观察到费城（Ph^1）染色体，它是染色体易位使得 *bcr* 和 *abl* 基因融合而产生的（4.6 节）。有进一步的证据表明，正是这个特别的易位作为遗传损伤导致了 CML。

CML 患者中大量不同类型的造血细胞可能含有 Ph^1 染色体。这些造血细胞包括淋巴细胞（B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞）及骨髓来源的细胞（包括嗜中性粒细胞、粒细胞、巨核细胞和红细胞）。此现象说明易位最初发生在所有这些细胞的共同祖先——多能干细胞中（图 12.4）。与其他干细胞一样，这种造血干细胞（HSC）在造血系统尤其是骨髓中有很长的寿命。特别是在 CML 中，某一个遭受严重突变的干细胞，形成了 Ph^1 染色体，仍然保留分化成不同类型造血细胞的能力。此外，其他类型的造血干细胞紊乱也可以证明干细胞是肿瘤形成的初始靶点（信息栏 12.1）。

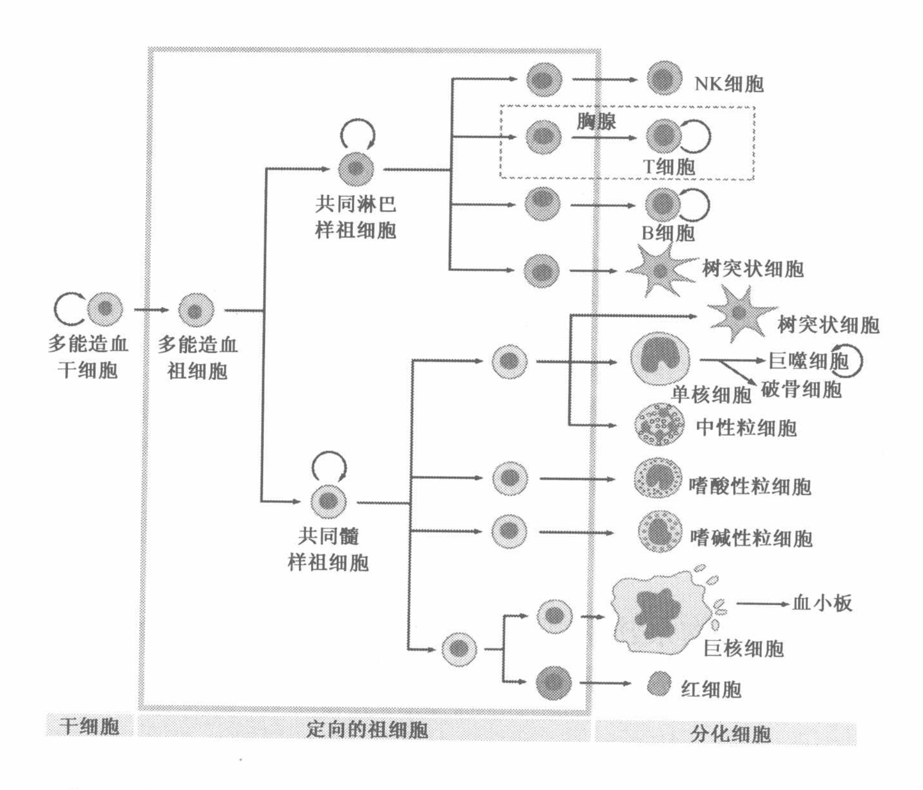


图 12.4　造血细胞分化　目前，我们对造血细胞有如下认识：①仅一种细胞类型——多能造血干细胞（HSC；左），就可以产生血液和免疫系统中的所有类型的细胞；②多能造血干细胞可以产生“定向”的祖细胞，两种类型的祖细胞分别产生淋巴细胞和骨髓细胞；③不仅 HSC，而且定向祖细胞（如图所示的淋巴干细胞和骨髓干细胞）和它们的一些子代细胞也存在自我复制的能力（圆形箭头）。在慢性髓细胞白血病（CML）患者中不同分化阶段的淋巴细胞和骨髓细胞都携带 Ph^1 染色体（*BCR-ABL* 易位），这说明这种异常染色体在多能干细胞或者祖细胞中就已经形成。（From B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002.）

更有力的证据来自转基因小鼠实验。在转基因小鼠中，活性 *ras* 癌基因的表达仅仅局限于皮肤中的角化干细胞（位于毛囊中）和开始进入终末分化状态的角化细胞中。当转基因驱动 *ras* 癌基因在干细胞中表达时，小鼠就会产生恶性肿瘤。相比之下，当同样的癌基因在分化的角化细胞中表达时，只形成良性的绒毛状瘤，并且有恢复正常的趋势。

从多种组织获得的证据得出一个结论，多种类型的自我更新细胞是遗传改变的靶点，这些遗传改变迟早会导致肿瘤的形成。一些情况下，靶细胞可能是具有无限自我更新能力的干细胞；其他细胞如“定向祖细胞”在正常情况下只有有限的能力进行自我更新，而在肿瘤形成过程中则可能获得无限自我更新能力。这个理论反过来可以解释某些人类肿瘤，如乳腺癌复杂的流行病学现象（见补充材料 19）。

信息栏 12.1　分化阻滞是造血系统恶性肿瘤发展中的常见事件　在动物和人类中许多恶性肿瘤的形成是由于分化阻滞所致。在遗传学中第一次提出此类现象可能与鸟类成红细胞增多症病毒有关。这是一种反转录病毒，编码两种癌蛋白：其 *erbB* 癌基因特异性编码表皮生长因子受体（EGFR）的组成性活化形式（参考 5.4 节），能够促进成红细胞（红细胞的祖细胞）的增殖；而 erbA癌基因编码一个核受体（甲状腺激素受体的同源物），可以阻止 *erbB* 导致的过渡增殖的成红细胞的分化。同样，在人类急性髓性白血病（AML）细胞中发现的大量遗传损伤可以分为两个功能亚群：一类是促进骨髓前体细胞增殖所必需的；另一类是相同细胞中阻滞随后的分化所必需的。

Down 综合征患者以一定频率出现巨核母细胞白血病（血小板前体细胞恶性肿瘤），编码 GATA1 转录因子的基因经常发生突变，从而阻止这些血小板前体细胞正确的成熟和分化。这几个例子说明，必须阻止细胞从干细胞区室中的脱离才能形成肿瘤。

这些观察中并未阐述转化的干细胞靶点是如何被准确鉴别出来的。许多情况下，靶点很可能不是多能造血干细胞，而是已经注定分化的一个子代细胞。这些“定向祖细胞”（图 5.4）一般具有显著的（但是是有限的）自我更新的能力，并且没有完全分化，因此可被看作是干细胞。它们从正常到肿瘤干细胞的转化经历了许多变化，获得无限的自我更新能力即是其中之一。

12.3　凋亡、药物泵出和 DNA 复制机制为组织提供了一条将突变干细胞的积累减至最低的途径

正常干细胞作为转化靶点的突出作用显示，这些细胞的基因组必定会受到周围细胞和组织的保护。为了达到这一目的，这些细胞和组织会动用任何可用的生物和生物化学策略。我们已知的两个策略是：干细胞相对低频的 DNA 复制以及将干细胞安置在解剖学上被保护的位置。然而，这些机制似乎并不够，所以生物体还发展了其他的策略。

鼠肠隐窝和乳腺中的干细胞（图 12.2）是研究这些保护机制的好材料。很显然，隐窝中的干细胞需要额外的保护机制：估计鼠小肠隐窝中的肠干细胞一生会经过 1000 次连续的生长分化周期，每一个循环都会使干细胞受到多种遗传损伤。同样地，在人类消化道中，每年发生分化的细胞数目大大超过了任何时期存在于整个机体中的细胞数目总和；这么强大的有丝分裂活性必须依赖于干细胞的连续分裂，虽然人类中具体的数目还不清楚。这些分裂活性大部分与过渡-扩增细胞有关。

已有人提出一种隐窝中干细胞对抗大量遗传损伤的保护机制。在鼠小肠隐窝中，遭受 X 射线照射而造成遗传损伤的干细胞将快速启动凋亡，而不是停止增殖或试图修复损伤。这种行为可能与 DNA 修复的易错特征有关。后面我们会讲到，DNA 修复装备非常高效，但是很难精确，因此经常在染色体 DNA 中遗留下未修复或错误修复的残基。如果细胞的 DNA 复制装置遇到这种损伤，它们能使突变的 DNA 序列得以复制并遗传到子细胞，包括自身将成为干细胞的子细胞。因此，鼠隐窝中的干细胞 DNA 发生损伤时会首先激活凋亡而不是发生突变。其他组织的干细胞是否也同样进入凋亡还不清楚。

在某一组织的大量细胞中通过流式细胞术（FACS；图 11.13）分离干细胞的常用技术提示有另一种可能的保护机制。干细胞能够有效地迸出某些荧光染料分子，然而由

这些细胞分化产生的细胞泵出染料分子的能力不是很活跃。因此，将细胞群体暴露于这样的染料之后，干细胞染色的荧光信号强度就会较其他细胞染色弱。

染料分子活跃的分泌取决于膜蛋白 Mdr1（multi-drug resistance 1）的作用，它的发现是由于多种肿瘤细胞利用其泵出物质，从而获得化疗药物的抗性。在多种干细胞中 Mdr1 的异常高表达似乎是其保护基因组免受可以进入细胞质中的潜在诱变物质破坏的策略。

不对称的 DNA 链分配机制在防止某些组织中干细胞遗传损伤的累积方面也起到很大重要的作用。支持这种可能机制的实验结果还不完整，在这里讲述是因为其对于了解肿瘤发病具有重要意义。

1975 年首次提出这种策略的理论来源于干细胞中 DNA 复制的分子机制。我们回顾了干细胞分裂模型：干细胞分裂时通常都是不对称的，一个子细胞成为干细胞，另一个进入分化途径，产生过渡-扩增细胞（图 12.1）。理想状态是仍为干细胞的子细胞相对于注定要分化的子细胞应该得到更多的保护，因为后者的后代注定是要被遗弃的。正如图 12.5A 所示，DNA 链的不对称分配能够实现这一目的。

这个理论仍然是基于 DNA 复制的易错性。因为 DNA 聚合酶能产生逃脱检查和修复的错误，所以估计一个细胞每次通过 S 期复制 DNA，其基因组都会发生几个核苷酸的替代（这个数字极大地低估了 DNA 复制中的错误）。其结果是最近的一轮 DNA 复制过程中未合成的 DNA 链，即保守链，相对于作为 DNA 合成产物的非保守的链来说，更可能维持野生型序列。

这些表明，在精心设计的组织中，不是由新近 DNA 复制产生的 DNA 链应该被保留于干细胞区室的子细胞中，而那些近期 DNA 复制的产物应该被分配到其后代注定要进行分化并且死亡的子细胞中。图 12.5A 显示，一条 DNA 链（保守的，不变的链）理论上可以通过不平衡的 DNA 分子分离机制分配到干细胞中。换言之，干细胞中总是有一条 DNA 链反复地作为 DNA 复制的模板链，而这条链很少是由 DNA 的复制产生的（至少在成熟组织第一次形成的时候是这样）。图 12.5A 中演示了一小段 DNA 的行为，可以想象干细胞的整条染色体 DNA 也以这种方式分裂。

不对称分配模型（也叫保守链模型）可以用实验证明。事实上，图 12.2C 就是一个明显的证据。此例中干细胞在很短的时间内允许 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷的掺入。这一放射性前体通过 DNA 复制掺入 DNA 链中，一段时间之后掺入停止（这一实验过程通常被称为“脉冲示踪标记”）。放射性标记的 DNA 分子可以用**放射自显影示踪**，具体操作是将感光乳胶置于组织切片上，**氚衰变**时发射的射线会使乳胶上产生肉眼可见的黑点。如果 DNA 链的分配是对称的，我们可以推测一些放射性标记将保留到干细胞层，其他的将分散到那些离开干细胞层的分化细胞中。

图 12.2B 表明，所有放射性标记的 DNA 链都随着过渡-扩增细胞开始分化而离开干细胞层。这一结果支持以下观点：新合成的链（如那些在 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷环境下合成的链）优先进入由过渡-扩增细胞而来的子细胞，它们的子代细胞进一步分化，最后离开隐窝。相反，我们发现留在隐窝干细胞层细胞中的 DNA 链很难被标记。

事实上，这种现象还有另外一种解释：放射性标记离开了干细胞层，因为其被干细胞重复的生长分裂周期稀释了。这种观点可以用以下方法验证：在干细胞层扩大时，将

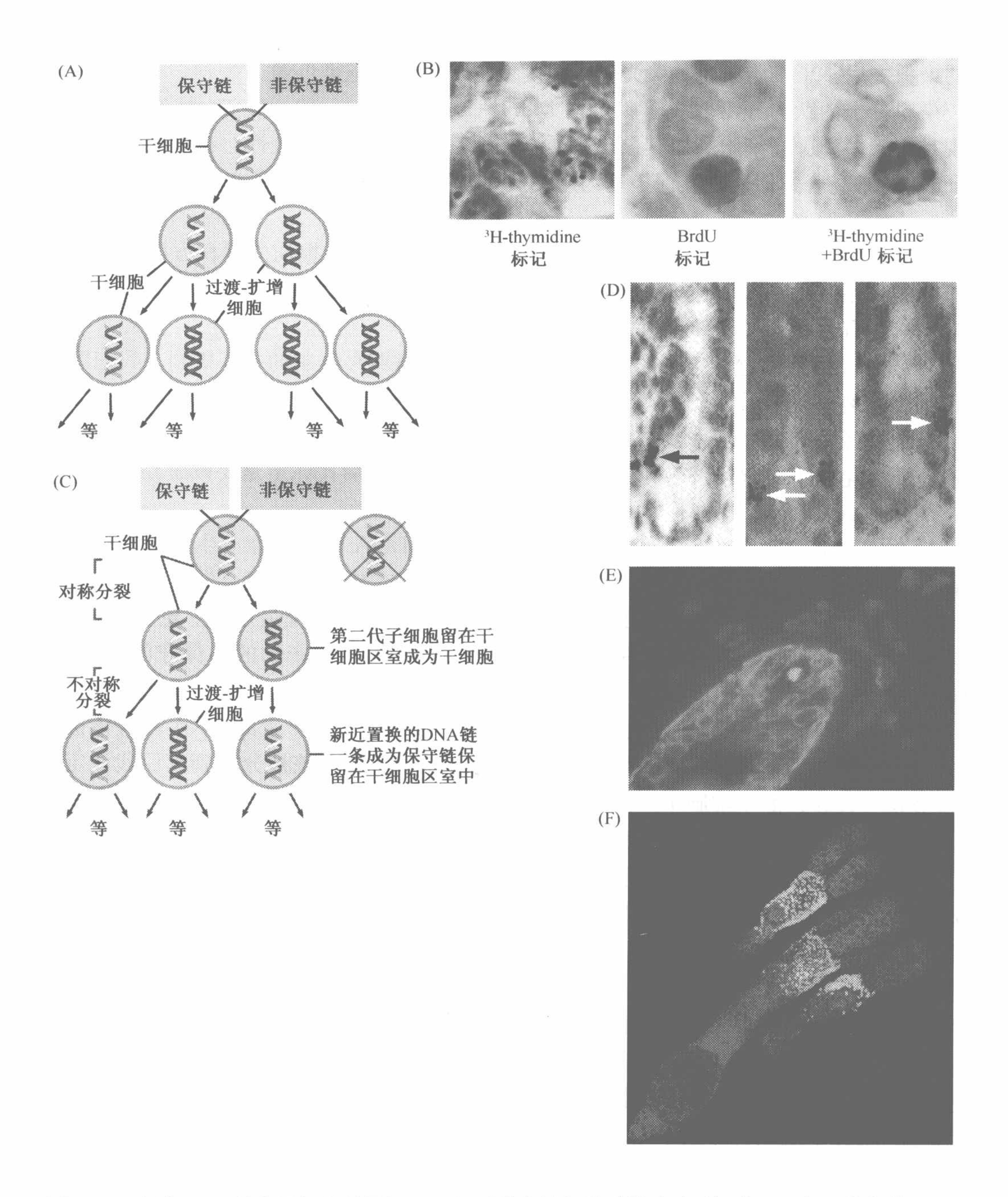


图 12.5　保守 DNA 链和干细胞基因组　(A)"保守链"模型描述了干细胞（蓝色）染色体 DNA 中一条保守 DNA（黄色）通过细胞分裂后进入某一子代细胞中，使得这个细胞成为干细胞并仍旧停留在干细胞层；这条保守链并非 DNA 近期复制的产物。相反，"非保守链"（红色）是 DNA 新近一次复制的产物，它将被优先分配到过渡-扩增的细胞中（亮绿色）并且离开干细胞层；每一轮 DNA 复制都给母细胞中增加一条新的非保守链。这个模型预测将会有一条 DNA 链始终停留在干细胞层而不复制。(B) 这一预言在小鼠乳腺中得到验证。当小鼠处于青春期时，乳腺不断增长，乳腺上皮干细胞不断增加，如果在这一时期将小鼠暴露于脉冲式^{3}H-胸腺嘧啶核苷环境中，将迫使

干细胞暴露于^{3}H-胸腺嘧啶核苷环境中，此时干细胞必须通过对称分裂扩大数量（图12.3C）。这样，两条放射标记的DNA链都将保留在干细胞层中。在青春期小鼠（乳腺生长较快）乳腺上皮干细胞中掺入^{3}H-胸腺嘧啶核苷时可以观察到这种现象（图12.5B）。在这种情况下，放射性标记可以在干细胞层中保留几周之久，即使这些标记存留细胞（LRC）在随后的时间里分裂很活跃（放射性标记的链来自数代之前的祖先，这些细胞经过不断的生长分裂仍然保留放射性标记）。

另一种检验保守链模型的方法是将一部分干细胞用X射线杀死，干细胞层中的其他细胞将会通过对称分裂试图替换丢失的干细胞。这样，两个子细胞都成为干细胞（图12.3B）。结果，本应进入分化子细胞的新生DNA链，现在却转化成为保守链留在干细胞层（图12.5C）。

当丢失的干细胞被替换后，再将小鼠肠隐窝内的干细胞层暴露于^{3}H-胸腺嘧啶核苷环境下，我们确实标记了那些之后保留在干细胞层中的DNA分子。也就是说，被标记的分子在后来暴露于非放射标记的胸腺嘧啶核苷前体时没有离开干细胞层（图12.5D）。因此，在成年动物干细胞层中引入长久的放射性标记的唯一机会就是杀死干细胞层中的一些干细胞。在这种情况下，保守链和新合成的非保守链都保留在干细胞层中，稳定的停留在小肠的隐窝中。

在其他上皮组织中也可以找到仍然保留标记的细胞（图12.5E和F）。尽管在小鼠中收集到许多证据，但“保守链”模型在很多组织中还留有很多猜测，尚需更多的实验证据支持这一理论。进一步验证“保守链理论”可能为癌变过程提供重要提示（信息栏12.2）。

（图12.5续） 细胞对称分裂，使得两个子代细胞都成为干细胞（图12.3C）。所以可以假设两条DNA链仍然都是保守链。因此，此时加入的放射性标记将会随机掺入两条DNA链中。掺入^{3}H-胸腺嘧啶核苷的DNA链在放射自显影后出现黑点。5周后，最初的^{3}H-胸腺嘧啶核苷只能在2%的乳腺上皮细胞中检测到（左），这时将小鼠脉冲式地暴露于胸腺嘧啶核苷的类似物——溴代脱氧尿苷（BrdU）环境中，有一种特殊的抗体可以识别掺入BrdU的DNA链（红色核，中间）。此后，检测BrdU时发现，那些有BrdU掺入的细胞大多数仍然是有放射性标记的细胞（右）。因此，那些具有放射性标记的细胞在分裂了5周之后仍然具有保守链，这些保守链是在5周前合成的，并且在反复的生长分裂过程中都没有丢失。（C）当干细胞群中丢失一个成熟的干细胞（在这个群体中干细胞的数目应该保持不变），另一个存活的干细胞将会对称分裂，形成两个子细胞将作为干细胞补充干细胞库（图12.3B）。在这个子细胞中（右），一条DNA链之前是非保守的（红色），这样最近一次复制的产物将停留在干细胞层变成保守链（黄色）。因此，可以用杀死一个成熟干细胞的方式标记干细胞DNA，而且标记将随机的保留在干细胞层。（D）小鼠十二指肠细胞的行为是这个预言的具体体现。在隐窝中肠上皮细胞来自靠近隐窝底部不断分裂的干细胞（图12.2A）。与（B）中一样，可以通过^{3}H-胸腺嘧啶核苷脉冲标记分裂细胞中的DNA，随后通过放射自显影检测。通常情况下，所有被标记的最初合成的DNA随着细胞的不断分化和转移一同离开隐窝，因而几天后被标记的细胞将在隐窝中消失（图12.2C）。然而，如果在标记之前用8Gy的X射线照射十二指肠（这将杀死一些干细胞），标记后连续8天都可以在隐窝中检测到被标记的细胞。图中箭头所示的是4例保留标记的细胞（LRC），精确定位于隐窝干细胞中。（E）在这个乳腺导管中，乳腺上皮细胞（MEC）中的角蛋白被染色（红色）。一个9周以前掺入BrdU的LRC可以通过免疫染色的方法被染成绿色。（F）在小鼠皮毛滤泡的膨胀部分可以找到LRCs，在这里有角质化的干细胞。这些细胞在产生后4周，可以人工诱导表达绿色荧光蛋白（GFP），并且之后将持续表达。这里上皮细胞标记为红色。（B. from G. H. Smith，Development 132：681-687，2005；D，courtesy of C. S. Potten；E，courtesy of B. Welm and M. A. Goodell；F，courtesy of T. Tumbar，V. Greco，and E. Fuchs.）

信息栏 12.2　一些致癌物通过其细胞毒性导致细胞突变　“保守链”模型对致癌物如何起作用提出了预测。例如，我们可以想象一些致癌物不是直接诱导突变的，而是通过它们的细胞毒性杀死组织中的细胞行使其功能的，包括其中的一些干细胞。这种致癌物杀死一个刚刚分裂形成的干细胞，和这个干细胞通过同一次有丝分裂的姐妹细胞可能会留在干细胞区域，而不进入分化细胞的行列（图 12.3B）。然而，这个姐妹细胞可能碰巧携带了 DNA 在最近一次 S 期复制产生的突变序列。一旦这个姐妹细胞进入干细胞区域，携带的这一突变的 DNA 链将变为“保守”DNA 链，从而使这种突变永远地存在于干细胞区域中。

在讨论肿瘤促进剂时，我们曾经提到过非基因毒性的致癌物（11.14 节）。因此，我们认为一些肿瘤促进剂（如乙醇）通过在靶组织中使细胞致死的能力起作用，导致组织中存活细胞的代偿性增殖。正如在干细胞生物学中对这些促进剂的认识一样，我们可以推测许多肿瘤促进剂是通过杀死干细胞行使功能的。一种更危险的试剂是“完全”致癌物（11.17 节），它既能作为起始剂诱导干细胞基因组突变，又可以作为促进剂通过对干细胞的细胞毒性起作用。

12.4　DNA 复制过程中产生的错误危及细胞基因组

干细胞区室的设计及每个干细胞的行为显示，组织运用多种生物学策略减少体细胞突变的积累。这些机制用来保护干细胞基因组，事实上这些干细胞组成了组织的“种系”细胞。重要的是，这些策略只代表了预防基因组损伤的第一道防线。下一道防线是依赖于各种蛋白识别和修复细胞内损伤的 DNA 分子。

实际上，DNA 经常受到各种物质和反应过程的攻击。为了简单起见，我们将这些突变的过程分为三类。第一，如前所述，细胞周期 S 期由 DNA 聚合酶进行 DNA 序列的复制时倾向于产生低频但很显著的错误。其中包括发生化学改变的核苷酸前体不小心掺入到正确的 DNA 中。第二，即使不存在诱变剂的攻击，DNA 分子中的核苷酸也会自发地发生化学改变，这些改变经常使 DNA 的碱基序列发生变化，从而改变 DNA 中包含的信息。最后，DNA 分子会受到各种诱变剂的攻击，包括正常细胞内代谢产生的分子及外来的化学和物理诱变剂（X 射线和 UV 射线）。我们将在下一节中介绍后两个过程。

负责几乎所有染色体 DNA 序列复制的分子机器发生错误的频率非常低。细胞核中基本的复制机器主要是由三类聚合酶 pol-α、pol-δ 和 pol-ε 驱动的。人类基因组中，共已发现 15 个不同的 DNA 聚合酶基因，而且很可能发现更多的 DNA 聚合酶基因。随后将会讲到，这些基因中很多并非参与 DNA 复制本身，而是参与了损伤 DNA 分子的修复。

细胞主要通过两种策略发现和去除 DNA 复制过程中产生的复制错误的核苷酸。第一种策略取决于 DNA 聚合酶本身，这些 DNA 聚合酶是结构上非常复杂的复合物，由众多不同的蛋白亚基装配而成。当它们沿着单链 DNA 模板，由 5′→3′方向延伸新生链时，DNA 聚合酶（如聚合酶 δ）会“不断回望”，扫描刚发生聚合的 DNA 的延伸链；这种监控通常被称为**校对**。当聚合酶检测到一个复制错误，就利用其 3′→5′外切酶活性反方向移动，降解刚合成的 DNA 片段，然后再重新复制这一片段，以期再次出现较好的结果（图 12.6）。

运用种系 pol-δ 编码基因微小改变（单个氨基酸替换）的小鼠品系能够在很大程度

上阐明这种校对机制对于癌症预防的重要性。得到的聚合酶 δ 突变体保留了其聚合酶活性，但丢失了 3′→5′外切酶活性；这一丢失使其校对功能丧失。49 只以纯合方式携带突变 pol-δ 等位基因的一组小鼠中，23 只在长至一年时出现肿瘤，而在数目为纯合体 2 倍的杂合体组中则没有出现肿瘤（图 12.7）。这一实验证明，通过 DNA 聚合酶来维持野生型基因组序列的正确性代表了对癌症发生的重要防御功能。而且，对于我们来说，这一观察首次表明，导致癌症的突变可能是通过内源性过程产生，而非由外界致癌物的侵入所驱动。

仅随 DNA 聚合酶和其校对活性之后的是一组很复杂的**错配修复酶**（MMR），这些酶监测新合成的 DNA，用以发现被 DNA 聚合酶校对机制忽略的错配 DNA 序列。

错配修复系统的作用在具有重复序列的 DNA 区域变得尤为重要。这些序列包括简单的单核苷酸重复（如 AAAAAAA）、二核苷酸重复（如 AGAGAGAG），以及更复杂序列的重复。由于链的滑动，即当亲本链和新生链从原有的位置滑出时，DNA 聚合酶在复制这些重复序列时呈现偶尔停顿的方式，使得新生链中掺入更高或更低拷贝的重复序列（图 12.8）。因此，A_7 序列 AAAAAAA 很可能造成聚合酶合成一个 T6 或 T8 序列的互补链。随之产生的插入或缺失可能逃避 DNA 聚合酶校对元件的监视，因此成为错配修复机器识别和修复的主要靶点。

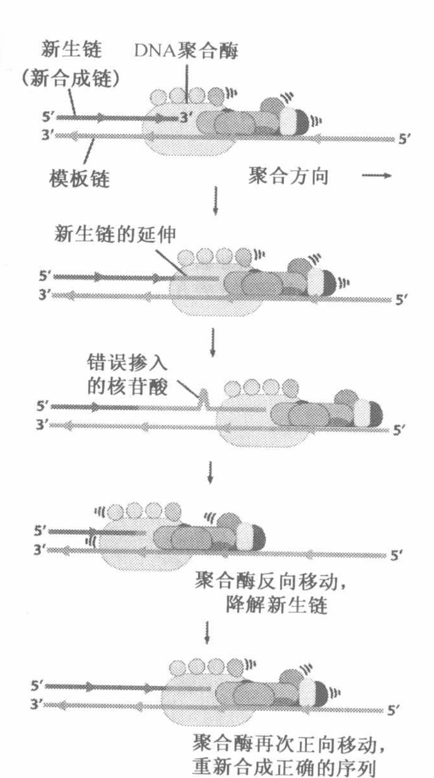


图 12.6 DNA 聚合酶校对 很多 DNA 聚合酶具有校对功能，能使保留在新合成链中错误掺入的碱基数目降到最低。因此，当 DNA 聚合酶按 5′→3′方向（向右移动）延伸新生链（深蓝色）时，将以已存在的 3′-OH 作为新生链的引物进行延伸（浅蓝色）。然而，如果碱基被错误掺入（第三幅图），由于 DNA 聚合酶不断检查生长的 DNA 链中是否掺入了正确的碱基，DNA 聚合酶就会以 3′→5′方向（向左）降解新生的延伸链（第四幅图），然后再重新合成新生链（最下面一幅）。

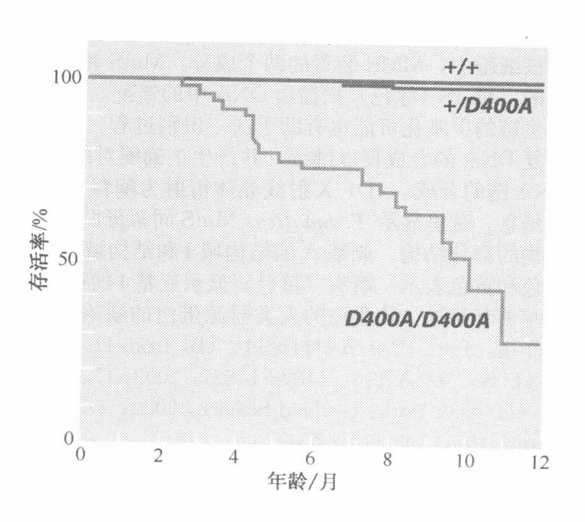


图 12.7 DNA 聚合酶校对和癌症的发生 点突变已被引入编码 DNA 聚合酶 δ 的小鼠基因的种系拷贝中，DNA 聚合酶 δ 是负责大多数前导链和后随链合成的哺乳动物 DNA 聚合酶。这一突变被称为 D400A，改变了聚合酶校对结构域中的氨基酸序列，使聚合酶分子 400 位的天冬氨酸被替换为丙氨酸。图中显示，53 只野生型小鼠（＋/＋），97 只杂合体（＋/D400A）和 49 只纯合突变体（D400A/D400A）的命运。突变纯合体的致死全部是由癌症所致；其中包括淋巴瘤、皮肤的鳞状细胞癌和其他几类频率相对较低的恶性肿瘤。杂合体中的两只死亡与癌症无关，而纯合体野生型小鼠全部存活至一岁。生存曲线由 Kaplan-Meier 分析得出的。（From R. E. Goldsby, N. A. Lawrence, L. E. Hays et al., Nat. Med. 7:638-639, 2001.）

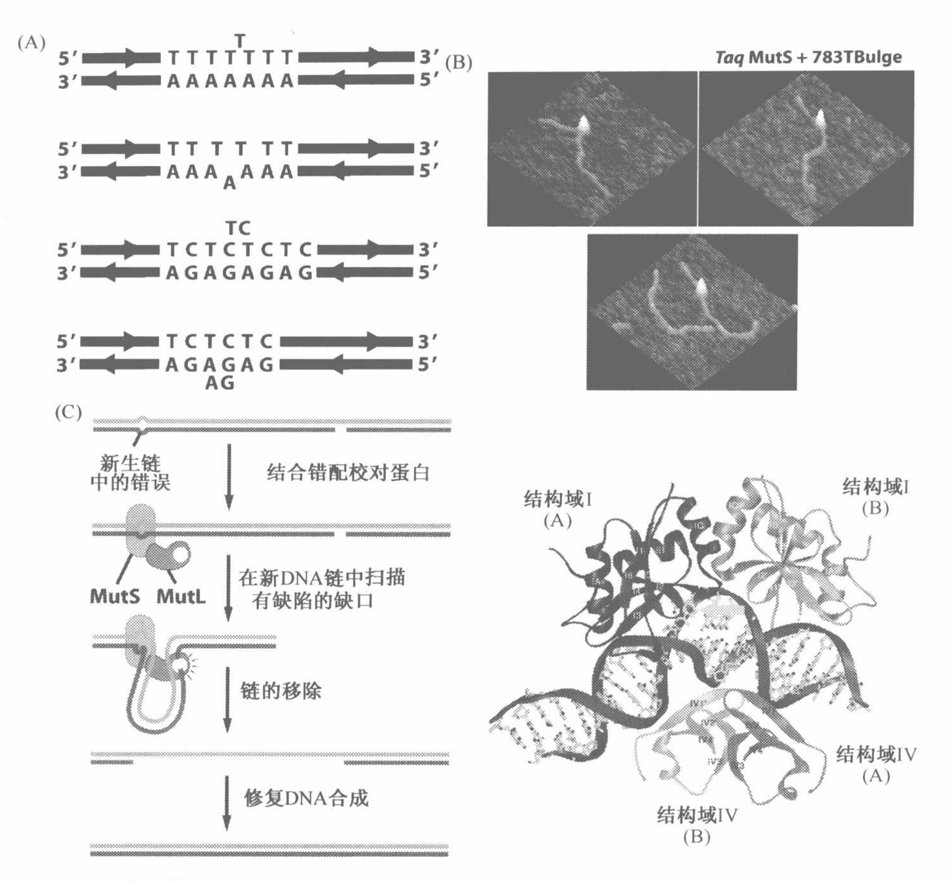


图 12.8 DNA 聚合酶错误和错配修复 （A）DNA 聚合酶，特别是 pol-δ，偶尔“停顿”，或跳过图中的模板链（蓝色）DNA 重复序列中的一个碱基（如微卫星序列）。因此，新生链（绿色）可能需要另外一个碱基以增加重复序列的长度，或缺少一个碱基（上面两张图）。相同的动力学可能导致微卫星序列相似的改变，这些微卫星重复单元是一个 TC 双核苷酸片段（下面两张图），或是一个更复杂的重复序列（未显示）。（B）错配修复（MMR）蛋白的功能是识别和修复由 DNA 聚合酶造成的错误，包括错误掺入的碱基和微卫星序列的非正确复制。一种有效的用于观察单个 MMR 蛋白的技术是原子力显微术。在此，细菌 *Thermus aquaticus* 中的 MutS MMR 蛋白是许多哺乳动物 MMR 蛋白的同源体，已观察到它能结合于特定核苷酸位点错配的 DNA 片段。MutS 使 DNA 双螺旋扭曲，扫描并最终找到错配区域，以稳定的方式与这一区域结合，这里观察到的是白色金字塔形。（C）在真核细胞中，MMR 装置的两个成分：MutS 和 MutL，相互协调去除错配的 DNA。如同在 B 组中显示的，MutS（绿色）扫描出 DNA 中的错配，然后 MutL 扫描 DNA 单链缺口，识别新生链（红色）；新生链的甲基化可能也有助于这一识别过程。MutL 通过已被检测到的错配引发这条链的降解，使修复 DNA 的合成得以继续，并产生正确配对的 DNA 链。还不清楚 MutL 是否通过其他方式决定新 DNA 链的合成。（D）X 射线晶体衍射为阐释 *T. aquaticus* MutS MMR 蛋白的功能提供了更加具体的信息。这里显示 *T. aquaticus* MutS 同源蛋白二聚体与一个错配的双螺旋复合物（红色）形成的复合物的部分结构。亚基 A 的结构域 I 和结构域 II 由深蓝色和橙黄色表示，亚基 B 的相同结构域由浅蓝色和黄色表示。箭头（黄色）显示亚基 I 的第 39 位苯丙氨酸残基与双链的一条链中未配对的胸腺嘧啶核苷相连。该蛋白的人类同源蛋白的缺陷在引发遗传性非息肉结直肠癌（HNPCC）中起重要的作用，已在 12.9 节中讨论过。（B，from H. Wang，Y. Yang，M. J. Schofield et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100：14822-14827，2003；C，from B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002；D，from G. Obmolova，C. Ban，R Hsieh and W. Yang，Nature 407：703-710，2000）。

由于进化的原因，基因组高度重复序列中的每一个重复单位通常携带有100个或更多的核苷酸，被称为“卫星”序列。这里讨论的简单短序列在基因组中的很多地方都存在，所以它们被称为微卫星。有缺陷的错配修复系统在微卫星复制时不能发现和终止由DNA聚合酶产生的错误，造成后代细胞中序列长度的增加或缩短。所产生的遗传结果被称为微卫星不稳定性（MIN；图12.9），最终可能使成千上万的微卫星序列散布于整个细胞基因组中。

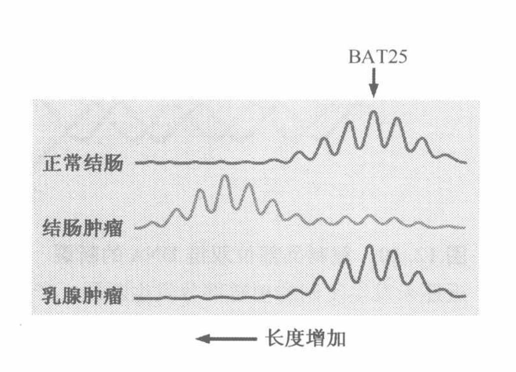


图12.9 微卫星不稳定性的检测 微卫星不稳定性（MIN）通常导致微卫星重复序列长度的延长或缩短。在此分析中，一个单核苷酸重复序列的长短可通过PCR（聚合酶链反应）得出，反应中引物结合于序列两端。位于人类染色体4q12上的BAT25序列由TTTTXTXTXT7XXT25序列构成，这里的“X”表示除T之外的核苷酸。由于PCR反应中聚合酶引入的错误，反应产物长度显示围绕扩增的基因组DNA片段实际长度的正态分布。这是一位患有HNPCC（遗传性非息肉结直肠癌）的女性，被诊断同时患有结直肠癌和乳腺癌。同时还对结直肠癌旁正常组织的DNA进行了分析，结果显示结直肠癌中微卫星重复序列的长度明显增加（向左移动），而乳腺癌中则有与正常的对照DNA完全相同的微卫星重复序列。这一结果有力地说明，乳腺癌不可能是由MIN引起的。（From A. Müller，T. B. Edmonston，D. A. Corao et al.，Cancer Res. 62：1014-1019，2002.）

然而，由DNA聚合酶产生的更细微的复制错误，如非重复序列中错误碱基的掺入，可能也会被错配修复蛋白检测出来并清除掉，这些蛋白对由错误核苷酸掺入所造成的双螺旋中的突起和环状结构高度敏感。错配修复机器能够区分新合成的DNA链和作为模板的“亲本链”，使MMR装置的注意力集中于清除和修复新合成并有缺陷的DNA链（图12.8C）。错配修复涉及切除错配的核苷酸并重新合成这一链。

综上所述，这些不同的错误修复机制，可能产生极低频率的错配碱基，其一旦幸存下来则成为突变的DNA序列。首先，DNA聚合酶在10^5个聚合核苷酸中仅产生1个复制错误。聚合酶的3′→5′校对功能每检查10^2个最初由聚合酶错误复制形成的核苷酸时，会发生一次疏忽，因此能够将错误率降至$1/10^7$个核苷酸。DNA聚合酶通过DNA延伸链后，错配修复蛋白将重新对新合成的DNA链进行检查。逃避了DNA聚合酶校对的、且错配修复酶不能修复的错配碱基仅占1/100。总体来讲，在DNA复制过程中仅产生$1/10^9$的极低突变率。正如我们将会预见的，这些错配修复机制中的缺陷能够导致家族性和散发性的人类癌症。

最后，DNA复制还会给基因组带来其他危险。一些数据显示，当细胞每通过一次S期，每个细胞基因组中就会发生10个双链DNA断裂事件。这些断裂似乎发生在距离复制叉较近的部位，可能是由于解旋成单链而仍未复制的DNA母链部位对于突然的断裂是敏感的（图12.10）。细胞已经具有完善的机制以对抗双链DNA的断裂，我们将在后面的章节中提到。这些断裂若不能得到正确修复将会导致很严重的后果，包括染色体断裂和易位。



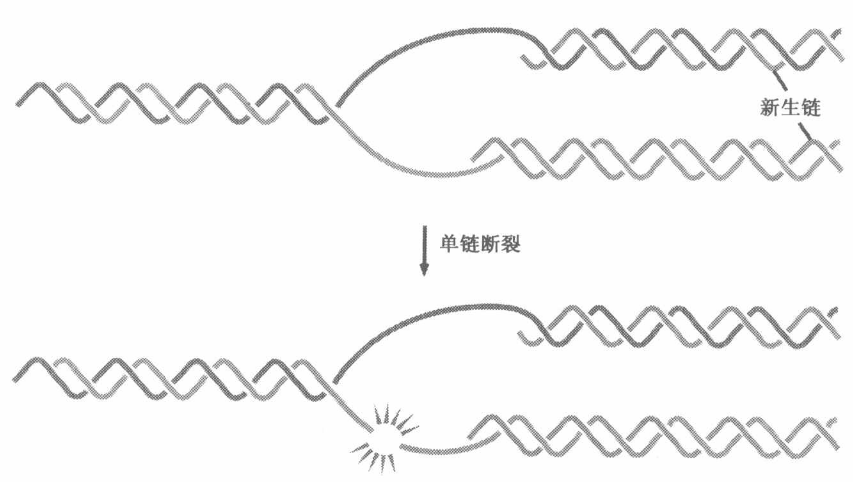


图 12.10　复制叉部位双链 DNA 的断裂　在 DNA 复制过程中，DNA 分子特别容易在复制叉附近还未发生复制的单链部分发生断裂。产生的断裂在功能上等同于在已形成双螺旋中发生的双链断裂，这是因为断裂使每一链上两个螺旋互不相连。

12.5　细胞基因组一直受到内源性生物化学过程的攻击

大多数对现代癌症研究起因的解释强调了致癌物的作用，它们通过多种途径进入机体，攻击细胞内的 DNA 分子，产生偶尔会导致癌细胞形成的突变细胞基因组。在这一癌症发病机制模型中，内源诱变因素及其诱变机制研究得还不清楚。然而，在最近几十年中，分析技术的敏感性大大增加，研究者们能够检测到正常细胞 DNA 中改变了的碱基和核苷酸，而这些碱基和核苷酸未曾受到过外源性诱变剂的作用。这些分析结果使人们转向思考存在于人类细胞基因组中大多数基因突变的起因，因为它们表明内源性生物化学过程通常比外源性诱变剂对于基因组突变有更强的作用。由于突变事件（如果不考虑其来源的活）具有潜在的致癌性，这就促使人们重新思考将会出现多少种人类癌症。

DNA 具有双螺旋结构，碱基朝向内部，以保护潜在的化学反应基团，尤其是碱基的氨基侧链，使其免受多种突变剂的各种类型的化学攻击。尽管 DNA 分子具有这样聪明的机制，其还是容易发生化学改变和物理损伤。一些损伤是通过中性 pH 条件下低浓度（约 10^{-7}mol/L）氢离子和氢氧根离子的作用造成的。在本章多次提到的**脱嘌呤**过程中，连接嘌呤碱基（腺嘌呤或鸟嘌呤）和脱氧核糖的化学键能够自发断裂（图 12.11A）。据估计，一个哺乳动物细胞每天通过脱嘌呤作用能丢失多至10 000个嘌呤碱基（这相当于人体内每天产生多于 10^{17} 个化学改变的核苷酸）。**脱嘧啶**作用以低于 20 倍到 100 倍的频率发生，但仍能使每个细胞每天丢失多至 500 个胞嘧啶和胸腺嘧啶。据估计，存在于单一人类基因组中无碱基核苷酸的稳定水平维持在4000～50 000 个。

同时，**脱氨基**作用可能会发生在鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶环中伸出的氨基基团，使氨基丢失，这一脱氨基作用分别产生黄嘌呤、次黄嘌呤和尿嘧啶（图 12.11B）。例如，

尿嘧啶在随后的DNA复制过程中可能被识别为胸腺嘧啶，因此造成C-T点突变，称为**转换性突变**，即嘧啶之间相互替换。通过脱氨基作用产生的碱基对于正常DNA来说都是外来的，因此能被识别出来，并被DNA修复酶去除。然而，任何逃避监视和被修复酶去除的碱基代表潜在的点突变来源。

(A) 鸟嘌呤 H_2O 脱嘌呤脱氧核糖 鸟嘌呤

(B) 胞嘧啶 → 尿嘧啶；腺嘌呤 → 次黄嘌呤；鸟嘌呤 → 黄嘌呤；5-甲基胞嘧啶 → 胸腺嘧啶

图 12.11　脱嘌呤作用和碱基脱氨基作用　(A) 频繁的自发脱嘌呤作用攻击DNA中的鸟氨酸，留下一个脱氧核糖。(B) 在中性pH条件下，脱氨基作用影响嘌呤和嘧啶碱基，能以不同频率自发发生，如果核苷酸序列不被修复，将导致核苷酸序列的改变。在每个例子中，红色标记的氮原子参与了与脱氧核糖-C1′共价糖苷键的形成。5-甲基胞嘧啶的脱氨基作用产生胸腺嘧啶（底图）；因为这一碱基天然存在于DNA中，并非总被修复机器识别为异常碱基，于是解释了在具有这一甲基化碱基位点发生频繁突变的原因。(Adapted from B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

5-甲基胞嘧啶——我们前面提到的甲基化胞嘧啶（7.8节）——通过自发脱氨基作用能以更高的频率产生胸腺嘧啶（图12.11B）。这将会给DNA修复机器带来很严重的问题，因为胸腺嘧啶（与上文提到的脱氨基作用的其他三种产物不同）是正常DNA的

组成成分，T：G碱基对可能因此而逃避监视，从而幸存下来，最终作为模板进入下一个DNA复制循环，造成C-T点突变。

实际上，5-甲基胞嘧啶的脱氨基作用是人类DNA中点突变的主要来源。据估计，内脏器官的肿瘤基因组中63%的点突变（如免受UV射线辐射的组织）发生在CpG序列中。在突变的*p53*等位基因中，大约30%似乎发生于野生型*p53*等位基因的CpG序列中。实际上这一比例可能有些被夸大了。例如，在肺癌发生过程中，甲基化CpG序列也是活化形式的苯并芘（12.6节），**苯并芘**（PAH）是存在于香烟烟雾中的一种多环芳烃，经常成为被攻击的靶点。因此，不是所有CpG位点发生的突变都是由脱氨基作用造成的。

然而，细胞内环境对于染色体DNA来说，还具有其他危险。其中最严重的来自于氧化过程，这可能比上面提到的反应对DNA产生的损伤更多。最重要的反应发生在线粒体中，在氧气逐渐被还原为水的过程中生成多种中间产物：

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -} + e^- \rightarrow H_2O_2 + e^- \rightarrow {}^{\cdot}OH + e^- \rightarrow H_2O$$

超氧离子　　过氧化氢　　羟自由基

一些中间产物，所谓的活性氧分子（ROS），可能会从线粒体中渗出，进入细胞质，从而到达细胞中其他部位。这样的中间产物包括超氧离子、过氧化氢和羟自由基。然而，作为多种耗氧酶的副产物还会产生其他的氧化产物，包括**过氧化物酶体**（参与多种细胞成分，特别是磷脂氧化反应的细胞质体）中的酶，以及由脂类自发氧化导致过氧化的酶。炎症反应也会为氧化剂提供重要来源，这些氧化剂倾向于带来突变和随之而来的致癌作用（信息栏12.3）。

信息栏12.3　炎症具有促分裂和诱变双重效应　组织的慢性炎症通常是由某些感染引起的，如肝的乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染、胃上皮的螺旋杆菌感染以及宫颈上皮的人乳头瘤病毒（HPV）感染（11.15节）。这些感染导致细胞死亡，以及存活细胞的代偿性增殖——上一节讨论过的一种肿瘤促进类型。

这些炎症反应也可以有直接的突变效应，这里将介绍怎样产生突变效应。免疫系统派遣细胞到感染部位，主要是巨噬细胞和嗜中性粒细胞；**吞噬细胞**在感染组织中破坏和吞噬被感染细胞。重要的是，吞噬细胞通过释放强大的混合氧化剂，包括一氧化氮（NO）、超氧化离子（$O_2^{\cdot -}$）、过氧化氢（H_2O_2）和次氯酸盐（OCl^-）杀死被感染细胞。这些具有高反应活性的化学物质不仅可以杀死细胞，而且可能通过留下大量的基因组发生损伤的存活的细胞导致间接损伤。如同正常氧化代谢的副产物，这些氧化剂作为诱变剂通过硝化、氧化、脱氨基和卤化作用产生化学修饰碱基使邻近细胞基因组发生突变。实际上，感染和致瘤组织具有较高浓度的8-氧化-dG（图12.12），这是DNA氧化的主要产物之一。具有这样氧化碱基的细胞突变频率增高，有助于解释为什么许多组织中慢性炎症有助于促进肿瘤进展。

在这些过程中产生的高反应活性分子，通常在几秒钟之内就能与细胞中很多其他分子形成共价键。DNA中的碱基是众多活性氧分子攻击的位点之一，包括嘌呤碱基和嘧啶碱基（图12.12）。另外，活性氧分子可以诱导单链和双链DNA的断裂，形成**脱嘌呤**和**脱嘧啶**位点（统称为**无碱基**位点，这些位点中的碱基从脱氧核糖上断裂下来；图12.11A），以及DNA-蛋白质的交联。如同下面将要介绍的，许多由此而改变的碱基由

修复机器识别，进而从 DNA 上被切除。一些被切下的碱基，包括从脱氧胸腺嘧啶二醇产生的胸腺嘧啶二醇和由 8-氧化-脱氧鸟嘌呤（8-oxo-dG）产生的 8-脱氧鸟嘌呤，可在哺乳动物尿液中对其进行检测并定量，从而为其在整个机体中的合成速率提供了一些信息（信息栏 12.4）。

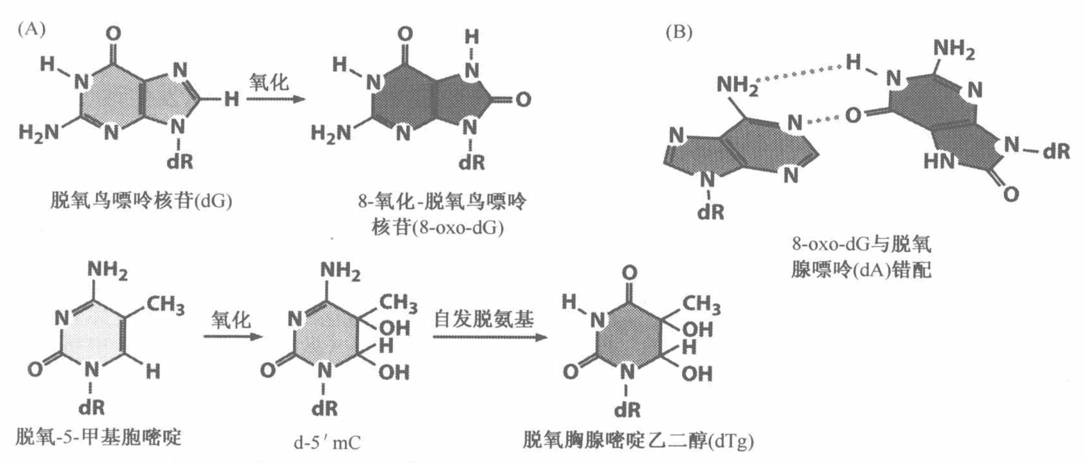


图 12.12 DNA 中碱基的氧化 DNA 碱基的氧化通常是由活性氧分子（ROS）的作用造成的，若没有随后发生的 DNA 修复反应，碱基就会发生突变。(A) 两种高频率的氧化反应，一种是脱氧鸟嘌呤核苷（dG）被氧化成 8-氧化-脱氧鸟嘌呤核苷（8-oxo-dG）；另一种是脱氧-5-甲基胞嘧啶（d-5′-mC），这一核苷酸存在于甲基化 CpG 序列中。后者最初形成一个不稳定的碱基，很快脱氨基，生成脱氧胸腺嘧啶乙二醇（dTg）。(B) 由 dG 氧化形成的 8-oxo-dG 能够与脱氧腺嘌呤（dA）错配，而非形成与脱氧胞嘧啶（dC）配对的正常碱基。因此，如果 8-oxo-dG 从双螺旋中去除，DNA 复制过程可能在其对面错误掺入一个 dA，而非 dC，导致 C-A 点突变。在上述所有图中，“dR”均代表脱氧核糖。嘌呤由深浅不同的红色和棕色表示，而嘧啶由深浅不同的绿色表示。

信息栏 12.4 尿液中的氧化产物为细胞基因组正在遭受损伤的频率提供评估标准 以目前的评估标准，一些人类细胞基因组每天遭受多达 10^3 次的氧化攻击，大约比碱基脱嘌呤作用频率低 10 倍。产生的氧化碱基大部分而非全部能被去除，并被适当的正常碱基替换。大鼠细胞基因组中每个细胞每天遭受的氧化攻击比人类细胞高 10 倍，因为它们的代谢速率大约比人类高出 7 倍（图 12.13）。任何未被修复的氧化损伤将随时间积累，尤其是在没有有丝分裂活性细胞的基因组中。

8-oxo-dG 是出现频率最高的核苷酸氧化损伤产物。大约 1%～2%的氧化核苷酸不能被 DNA 修复装置去除。氧化剂可能在 dG 掺入 DNA 之前氧化 dG 核苷酸前体；被氧化的核苷三磷酸接着可能代替 dGTP 掺入 DNA。或者，氧化剂可能在鸟嘌呤碱基掺入 DNA 后对其进行攻击。氧化 dGTP（如 8-oxo-dG 三磷酸）的重要性体现在，哺乳动物细胞能够利用一种特殊的酶——MTH1 降解这一氧化的 DNA 前体；缺失 MTH1 的小鼠与同类野生型相比，产生肿瘤的频率高 3～4 倍。然而另一种高度特异性的酶，称为 MUTYH，能够切除和 8-oxo-dG 碱基错误配对掺入 DNA 的腺嘌呤。从 DNA 上切除的 8-oxo-dG 大部分随尿液排出。

不幸的是，对 DNA 氧化产物的分析存在许多假象，主要包括体外 DNA 和核苷酸的随机氧化。曾有一个实验，DNA 制品被等分至欧洲的 21 个实验室用于测定 8-oxo-dG 的含量，结果分析评估值系数跨度超过了 200。近几年中，细胞基因组中氧化碱基数的评估值呈现大幅度下降。然而，根据最新且更保守的估计，正常人类细胞 DNA 中的 8-oxo-dG 残基维持在大约 3000 的稳定水平。这一水平相当于在黄曲霉素和杂环氨基等高致癌剂量化合物作用下，实验动物靶组织内 DNA 中发生化学成分改变的碱基的水平。

一些实验显示，在多种物种中这些成分的生成量与氧化代谢速率有直接的比例关系（图 12.13）。8-oxo-dG 的形成会有突变的危险，因为该碱基的一种构象可以很容易与 A 配对，在 DNA 复制过程中该碱基错配会导致 G：C 碱基对的替换，即 G：A 对变成 T：A 碱基对（图 12.12B）。这种 G→T 由嘌呤到嘧啶的替换（或相反）通常被称作**颠换**。然而，其他损伤可以通过碱基与 S-腺苷甲硫氨酸反应使碱基甲基化被引发。S-腺苷甲硫氨酸是细胞中一种常见的代谢中间物，携带高反应活性的甲基基团。总的来说，由氧化、脱嘌呤、脱氨基和甲基化产生的持续损伤，每天可能使每个细胞中成千上万的碱基发生改变，远远超过大多数组织中由外源诱变剂产生损伤的量。

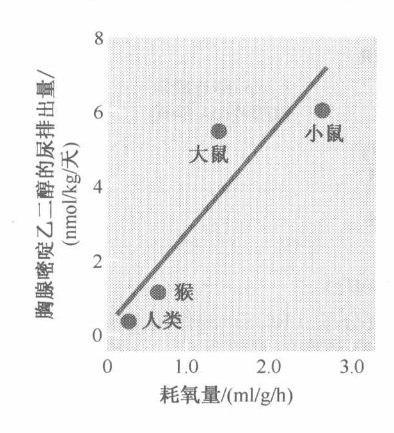


图 12.13 代谢速率和 DNA 氧化 在哺乳动物中，代谢速率和氧消耗速率与身体体积的变化相反，啮齿类动物的代谢速率比人类高一个数量级。图中显示，较高的耗氧率（ml/g/h，横坐标）与 DNA 碱基氧化的增长速率相关，DNA 的碱基氧化是由线粒体中氧化磷酸化的副产物 ROS（活性氧分子）产生的。胸腺嘧啶乙二醇（纵坐标）是从 DNA 中切除嘧啶碱基后的产物（见图 12.12），存在于脱氧胸腺嘧啶乙二醇中，这是一种常见的 DNA 氧化产物；这一碱基最终被分泌至尿液中。小鼠和大鼠中测得的分泌速率为每天每千克体重分泌 6nmol，相当于每天每个细胞中有 3000 个嘧啶被氧化。(From B. N. Ames, Free Radic. Res. Commun. 7：121-128, 1989; and from B. N. Ames and L. S. Gold, Mutat. Res. 250：3-16, 1991.)

12.6 细胞基因组偶尔遭受外源诱变剂及其代谢物的攻击

正如我们在文中反复提到的，细胞基因组也会受到外源诱变剂的损伤，这些外源诱变剂包括通过我们所吃的食物、呼吸的空气和进入机体的多种射线和分子。其中研究最多的外源致癌物是 X 射线，由于这种形式的电磁能量在细胞中产生离子化的、具有化学反应活性的分子，所以通常被称为“电离辐射”。细胞中由 X 射线储存的多至 80%的能量被认为用于从水分子中去除电子，产生的自由基接着会形成活性氧分子（ROS）。X 射线能够使 DNA 发生改变，因为它们通常形成可使 DNA 双螺旋中产生单链和双链断裂的自由基。之后将会讨论到，这些双链断裂通常很难被修复，而且可能偶尔会使染色体内发生断裂，这在显微镜下观察中期分裂相时可以见到。

与 X 射线相比，来自阳光的紫外线辐射是更加普遍的环境辐射来源。自从 35 亿年前生命第一次在地球上出现，生物体就不得不与紫外线进行对抗。大约 6 亿年前，当大气中的氧积累至很高水平的时候，由其形成的臭氧层为地球表面提供了防护层，大大降低了地球表面紫外线的辐射量。然而，仍然有大量的紫外线穿越臭氧层，到达生物圈。

紫外光子攻击皮肤细胞中的 DNA 常常会形成嘧啶二聚体。也就是说，在同一条 DNA 链两个相邻的嘧啶之间形成共价键。原则上，这些键可以在两个相邻的 C、两个相邻的 T 或者 C 和相邻的 T 之间形成。在哺乳动物中，A、C、G 和 T 的比例相似，多于 60%的嘧啶二聚体是 TT，另有约 30%是 CT，剩下的是 CC。如图 12.14，一对共价键在相邻的嘧啶之间形成，从而产生一个四碳环（环丁烷）。另一种不很普遍的 DNA 光反应产物，被称为**嘧啶（6-4）嘧啶酮**，也包含两个相邻嘧啶的共价交联。嘧啶二聚

体一旦形成，就非常稳定，能够在 DNA 中存留很长时间，除非它们被 DNA 修复酶识别并清除掉。

1-甲基腺嘌呤　3-甲基胞嘧啶　3-甲基胸腺嘧啶　1-甲基鸟嘌呤

图 12.14　紫外线照射产物和 DNA 的甲基化　(A) 紫外线 (UV) 辐射使 DNA 中相邻嘧啶碱基之间进行共价交联。当纯化的 DNA 被 254nm 的光子照射，形成的光反应产物中有 71%是环烃烷嘧啶二聚体 (CPD；图 A)，而 24%为嘧啶 (6-4) 嘧啶酮 (6-4 PP) 光反应产物。(B) CPD 的环烃烷环在 A 图中用红色标出。一个键将一个嘧啶的 6 位碳原子与 B 图中相邻嘧啶的 4 位碳原子相连。如 B 图所示，这些结构相对稳定，而且必须由转录偶联的修复和全基因组修复去除（将在 12.8 节中描述）。(C) 外源烷化剂能够通过将烷化基团与 DNA 相连从而使 DNA 碱基发生共价改变，如图中的甲基基团（橙黄色）。许多甲基基团可能也会通过 S-腺苷甲硫氨酸的作用内源性产生。S-腺苷甲硫氨酸携带一个高反应活性的甲基，在许多正常的生物合成反应中起重要作用。与脱氧核糖形成糖苷键的氮以粉红色表示。

这些**嘧啶二聚体**能够诱变的事实，在皮肤角化症（良性皮肤损伤）和基底细胞癌 DNA 中发现的 *p53* 突变谱型的改变中得到证实。在这些生长物中，许多突变的 *p53* 等位基因发生了嘧啶二聚体的置换。TT 二聚体是由紫外线照射形成最多的结构之一，但它只有弱的诱变作用，因为很多 DNA 修复和复制酶能够对其进行有效地处理，对此我们将在后面加以讨论。这就解释了为什么由 CC（而非 TT）二聚体而来的 CC→TT 置换是紫外线照射所致的最常见的突变。由于紫外线特征性地造成这一突变，这些现象为紫外线对人类皮肤具有直接诱变和致癌作用的观点提供了进一步的支持。紫外线辐射具有直接致癌作用的其他证据来自于流行病学研究：纬度每降低 10°，皮肤鳞癌的患病率

就会翻倍，在赤道处积累的紫外线照射量最大，患病率到达峰值。已如所预料的，这种 *p53* 突变类型可能在多种人类内脏器官肿瘤基因组中存在量极少，因为这些器官会受到保护，从而和紫外线辐射隔离。

多种化学分子能够从外界进入机体，经过化学修饰，而后与细胞中的大分子 DNA 进行反应。许多被修饰的化学分子是**亲电的**，它们寻找并攻击靶分子内富含电子的区域。最强的诱变剂之一是一类被称为**烷化剂**的化学物质，它们能够使烷基与 DNA 碱基共价交联（图 12.14C）。

碱基的烷基化可能使其与脱氧核糖间的共价键变得不稳定，造成 DNA 中嘌呤或嘧啶的丢失。另外，烷基化碱基在 DNA 复制过程中可能会被 DNA 聚合酶错读。由于它们强大的诱变作用，实验中烷基化试剂通常被用于诱导实验动物形成多种类型的肿瘤。而且，由于在临床上用于抗肿瘤化疗的特定烷化剂也具有强大的诱变作用，因此化疗会带来一个副作用，即可能会在另一个部位出现由于治疗所引起的新的肿瘤。

当被吸收的化合物在细胞中通过代谢途径发生改变时，就会形成很多功能强大的诱变剂。以苯并芘（BP）为例，它是一种强致癌剂，属于多环芳烃类（PAH），即多个苯环以多种方式组合在一起的分子（见图 2.22）。20 世纪 20 年代末，在英国进行的一项实验表明，这一化合物是煤焦油中复杂的混合物中一种作用显著的致癌剂。

一组复杂的细胞色素酶 P-450（Cyp's）家族的酶，被细胞用于氧化多环芳烃。已在人类基因组中发现 46 个编码 P450 的基因。细胞运用这些酶解毒外来化学分子，并将其转变为可溶的并易于分泌的分子（图 12.15A）。然而，这一解毒作用的副作用通常是产生对 DNA 分子有高反应活性的，具有活跃诱变性的化学分子（图 12.15B）。其结果

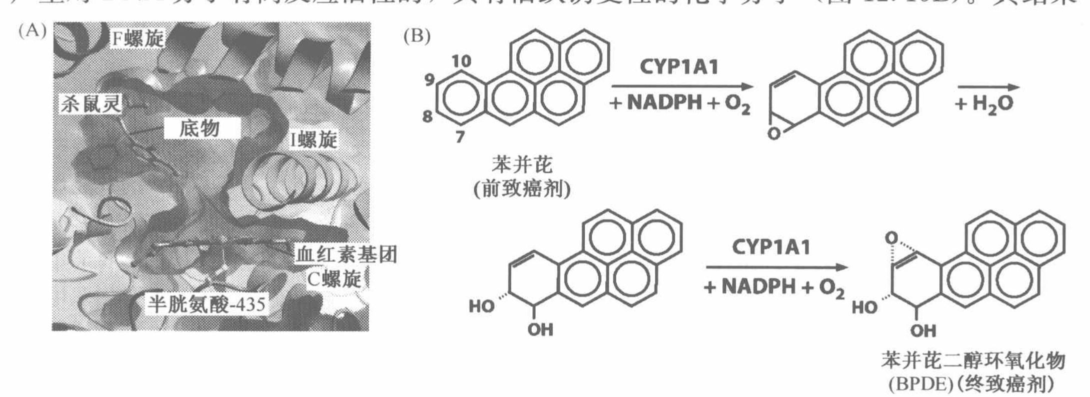


图 12.15 细胞色素对前致癌剂的作用 （A）细胞色素 P-450s（Cyp's）参与了多种代谢物的生物合成过程，如类固醇激素、胆固醇和胆汁酸等，也参与了一些化合物的降解，如脂肪酸和类固醇。另外，它们被用于协助进行氧化作用和对多种异生化合物（来源于体外的化合物）相应的解毒作用，如药物和致癌剂。这里显示的人类 CYP2C9 的底物结合腔中具有一个异生化合物分子杀鼠灵（同时作为抗凝血剂药物和鼠药使用；底物，上方），与杀鼠灵分子并排排列的是亚铁血红素环（下方），其功能是氧化杀鼠灵而使其被解毒。Cyp's 大的底物结合腔使其能够容纳很大体积的底物，大多数底物是疏水性的。（B）进入体内的外源化合物有多种多环芳烃（PAH），它们来自于香烟的烟雾、烧烤的食物和被污染的环境。一种常见的外源化合物是苯并芘（BP，最左侧），由细胞色素 P450（大部分是 CYP1A1）介导的两个连续的氧化反应之后，BP 就被转变为苯并芘二醇环氧化物（BPDE）（最右侧）。这一高反应活性分子被称为终致癌剂（2.9 节），与 BP 前体不同，它能直接攻击 DNA 碱基并与其形成共价加合物，从而产生致癌突变。（A，from P. A. Williams，J. Cosine，A. Ward et al.，Nature 424：464-468，2003；B，from E. C. Miller，Cancer Res. 38：1479-1496，1978.）

是，无活性的前致癌剂会被转变为反应活性高的终致癌剂，通过与不同碱基之间形成共价键直接攻击 DNA 分子。致癌剂与 DNA 碱基反应形成的化学基团通常被称为 **DNA 加合物**（图 12.16）。

图 12.16 DNA 加合物 苯并芘二醇环氧化物（BPDE；见图 12.15B）中的具有化学活性的环氧基团可以攻击 DNA 中很多化学位点，包括鸟嘌呤的环外胺（图中所示）以及碱基上的双环氮和 O^6（未显示）。由于细胞可能以不同的效率清除各种加合物，所以 BP 中的 O^6 加合物可能比图中通常形成的加合物具有更强的诱变作用。尽管多环芳烃和 BP 已被研究了半个多世纪，而且一些间接证据也提示其有重要功能，但它们对于人类癌症发展的确切作用仍存在很多争议。

在多数情况下，具有化学反应活性的终致癌剂几乎在刚一形成的时候就对其他分子进行攻击，因此在很短时间内即可检测到它们以游离分子的形式存在。这表明许多由活化的致癌剂造成的遗传损伤与这些分子启动的代谢激活途径存在于相同的细胞内。例如，上面提到的煤焦油中含有的一种重要的致癌成分苯并芘（BP），也是香烟烟雾中的一种重要的致癌成分，通常在其进入的第一个细胞中被激活——吸烟者的肺上皮细胞。在引发肺癌的突变的 *p53* 等位基因中发现了一些特有的碱基置换（图 12.17），提示活化产物苯并芘二醇环氧化物（BPDE）一旦形成，就会直接与这些上皮细胞 DNA 中的鸟嘌呤残基形成加合物。

最强的外源致癌剂之一是由曲霉菌类真菌合成的黄曲霉素 B1（AFB1）。曲霉真菌生长在保存不当的花生和谷物上。生活在 AFB1 高剂量环境中的人患肝癌（HCC）的风险升高 3 倍，而感染慢性肝炎 B 病毒的人患此病的风险将升高 7 倍。在一些地区，被这一病毒感染并食用过被 AFB1 污染食物的人患萎缩性肝癌的风险升高 60 倍（图 12.18A）。

AFB1 一旦被肝中的细胞色素 P-450 激活，产生的代谢物就能攻击鸟嘌呤，并通过共价键连接至该碱基从而形成一个 DNA 加合物（图 12.18B）。AFB1 导致 DNA 中发生特定的 G-T 突变。由于暴露于 AFB1 而形成的肝细胞癌中，有一半在肿瘤抑癌基因 p53 第 249 位密码子处发生点突变，即 AGG→AGT。DNA 中这些特定的变化为 DNA 中碱基与诱变致癌剂发生直接的相互作用提供了重要证据。

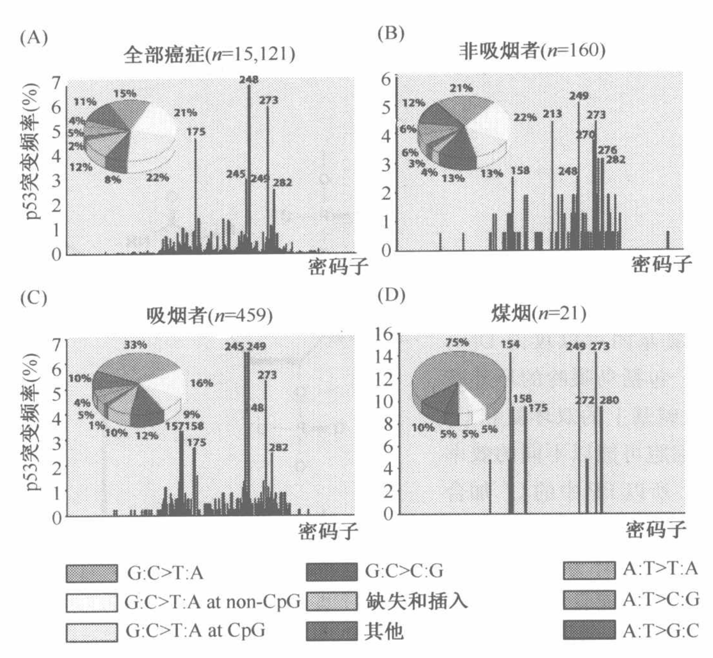


图 12.17 诱变剂造成的 p53 点突变 人类肿瘤细胞携带的 p53 等位基因中点突变的发现为鉴定造成这一突变的诱变剂提供了线索。(A) 所有类型的癌症;(B) 非吸烟者的肺癌;(C) 吸烟者的肺癌;(D) 接受煤烟排放物的非吸烟者的肺癌。图中各种情况中,被分析的肿瘤数量均用 *n* 表示。饼状图:在具有多于 15 000 个 *p53* 等位基因突变的多种肿瘤患者中发现有 15%具有 G:C-T:A(如 G-T)的颠换。然而,在非吸烟者的肺癌中,21%突变的 *p53* 等位基因携带有这一颠换,而肺癌中由吸烟造成的 33%突变的 *p53* 等位基因显示有颠换,曾反复暴露于煤烟排放物环境中的非吸烟者的肺癌中 75%存在颠换。已在实验中发现,G-T 颠换通常是由苯并芘(BP)诱导的,BP 被认为存在于化石燃料和香烟的燃烧产物中。另一条关于诱变过程的线索是由 *p53* 基因中多种点突变的位置提供的,其意义仍不是很明确。

另一个研究比较多的外源致癌剂是杂环胺(HCA),它们是多种肉类在高温烹制时大量形成的一类分子(图 12.19A)。这些化合物是通过细胞中自然形成的分子之间的作用形成的,这些分子主要是肌氨酸、葡萄糖磷酸及二肽和游离氨基酸。HCA 无疑具有致癌作用,例如,肉类高温烹制过程中形成最多的化合物 2-氨基-1-甲基-6-苯丙咪唑[4,5-b]嘧啶(PhIP),能导致大鼠形成结肠癌和乳腺癌,导致小鼠形成淋巴瘤。PhIP 被认为是人类饮食中最主要的 HCA(补充材料 20 ◎)。

一旦杂环胺进入细胞,细胞就利用细胞色素 P450 氧化这些分子。一些细胞色素 P450 氧化杂环胺的环,另一些则氧化环外的氨基,即那些由环伸出的基团。细胞色素 P-450对环的氧化作用可以成功地解毒。然而,氨基氧化会形成易与蛋白质和 DNA 形成共价键的具有高度活性的化合物(图 12.19B)。当这些化合物和 HCA 的其他化学变构体在肝脏中大量积累,生成的活性分子通常都会在肝脏中保留很长时间后才被释放,然后通过血液循环进入其他器官。在这些器官中,它们可能通过攻击 DNA 从而发挥其诱变活性。例如,人们怀疑烹制瘦肉时产生的杂环胺是西方人前列腺癌发病率较高的原因。总之,很多这样的例子(虽然在此仅能提到很少一部分)说明以高浓度存在于肝细

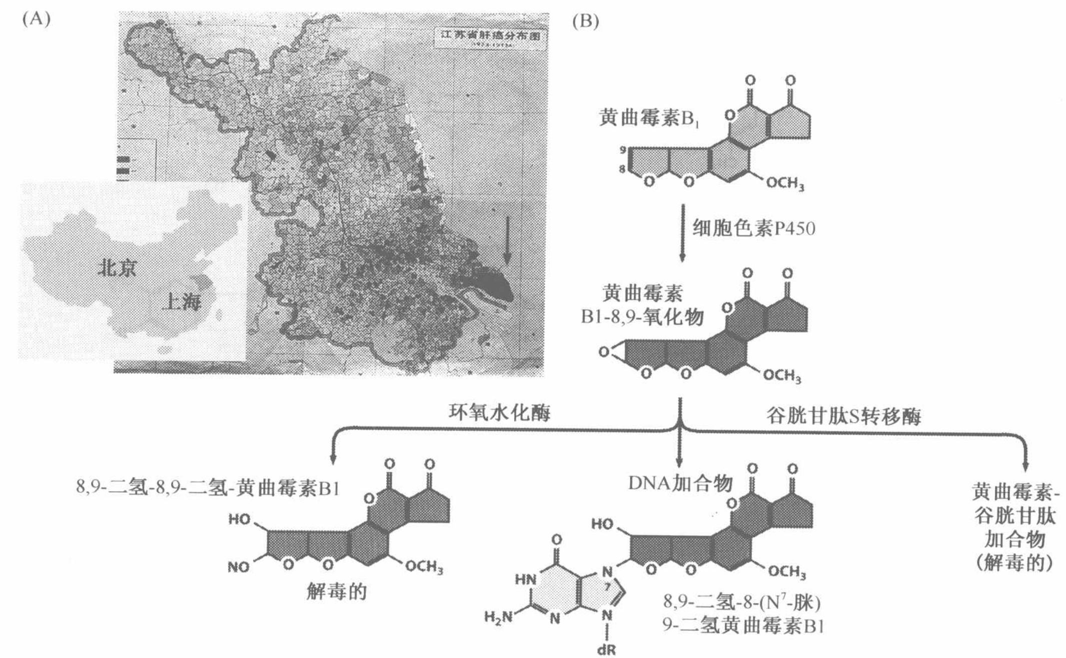


图 12.18 黄曲霉毒素和肝癌 (A) 真菌毒素黄曲霉素 B1 (AFB1) 是由生长在保存不当的花生和谷物上的真菌产生的，这些花生和谷物主要被保存在高雨量和潮湿的区域。在中国江苏省东南部潮湿的启东半岛(箭头)的肝癌(HCC)(棕色点)发病率比该省的西北部地区高 8 倍。HCC 发病机制中的一个重要协同致癌剂(第 11.15 节)——肝炎病毒 B (HBV) 感染的发生率在该省比较一致。(B) 细胞色素 P450 激活 AFB1 (粉红色) 产生高反应活性的 8，9-氧化形式。这一形式可能通过一些旁路反应(底部左边，右边)被解毒。然而，AFB1 的活化形式会以一定的频率直接与 DNA 相互作用，与鸟嘌呤的 N^7 原子形成共价加合物。实际上，生活在经常接触 AFB1 地区的肝癌患者经常携带一个特有的、突变 *p53* 等位基因，其 249 位密码子发生了的 G-T 颠换。准确地讲，这是一种从 AFB1 的已知反应活性推测出的突变类型。(A, from T. W. Kensler, G. S. Qian, J. G. Chen and J. D. Groopman, Nat. Rev. Cancer 3: 321-329, 2003; B, from J. D. Groopman and L. G. Cain, in C. S. Cooper and P. L Grover, eds., Interactions of fungal and plant toxins with DNA in chemical carcinogenesis and mutagenesis. Berlin: Springer Verlag, 1990.)

胞中的解毒酶产生的是基因毒性化合物，而不是在进化过程中无害的、易于分泌的化学物质的终产物。

一种观点认为，外源和内源诱变剂(后者包括 DNA 复制错误、自发脱嘌呤以及内源产生的化学物质的作用)是人类患癌的不同原因。对吸烟和非吸烟肺癌患者携带的突变 *p53* 等位基因内存在的特异的点突变进行分析的结果支持这一观点(图 12.17)。例如，G→T 颠换中嘧啶碱基(T)替换了嘌呤碱基(G)，在吸烟者肿瘤中 1/3 突变的 *p53* 等位基因都存在这一颠换。这一碱基置换与香烟中高浓度的多环芳烃，主要是苯并芘(BP)，已知的诱变作用是一致的。在其他种类的肿瘤(除了肝癌)中，这些遗传损伤较少出现在突变的 *p53* 等位基因中。而且，非吸烟者的肺部肿瘤中仅有大约 21%突变的 *p53* 等位基因表现出此类颠换，这个亚群中的大部分肿瘤很可能出现在被动吸烟者中，即那些生活中与吸烟者有密切接触的人。第 12.5 节中已经提到，非吸烟者的肿

(A)

Trp-P-1 Glu-P-1 AαC IQ

MeIQx Trp-P-2 Glu-P-2 MeAαC

MeIQ PhIP

(B)

CYP1A2

环外氨基

2-氨基-1-甲基-6-苯咪唑[4,5-b]-嘧啶

N-OH-PhIP

脱氧鸟嘌呤

图 12.19 杂环胺 (A) 这里显示的是 10 个杂环胺(HCA)的分子结构,它们是人类最常接触到的 HCA。由于这一类化合物中的每一种都是由多个环融合在一起形成的,因此而得名。这些环一般是由携带一个或多个伸出环结构的环外氨基基团的碳和氮形成的。HCA 是在高温下烹制各种食物(特别是瘦肉)产生的。据估计,PhIP 是美国人中饮食摄入 HCA 总量的 2/3。(B) PhIP (2-氨基-1-甲基-6-苯咪唑-[4,5-b]-嘧啶;粉红色)的环外氨基被 CYP1A2 氧化(为一种细胞色素酶 P450),产生高反应活性化合物 N-OH-PhIP(红色),可与脱氧鸟嘌呤(绿色)的 8-C 反应,形成一个诱变加合物(左下)。(A, from T. Sugimura, Carcinogenesis 21: 387-395, 2000; B, from M. Nagao and T. Sugimura, eds., Food-borne Carcinogens. New York: John Wiley & Sons, 2000.)

瘤中携带的其他突变的 *p53* 等位基因是更典型的 DNA 自发突变。

另一个关于苯并芘对人类癌症具有明显促进作用的观点来自于对乳腺癌的研究。一项研究显示,乳腺癌诊断时频繁吸烟的女性中肿瘤相关 *p53* 等位基因发生 G→T 颠换的概率比非吸烟者高出 10 倍。

由于亲电化合物和烷化剂已被成功地鉴定为是强诱变剂和致癌剂,人们设想其他一些通过食物、水或者空气进入体内的化学分子,也在刺激产生多种人类癌症中起类似的重要作用。然而,人类肿瘤的发生是否应归咎于人类环境或者食品中特定致癌物质的影

响仍是一件颇具争议的事情（11.18 节）。而且，可能除了少数外源诱变剂，包括紫外线辐射、香烟燃烧产物、黄曲霉素和杂环胺外，很少有其他诱变剂能够进入我们体内，造成遗传损伤并引起癌症。

12.7 细胞通过多种防御措施保护 DNA 分子免遭诱变剂的攻击

细胞保护自身基因组免遭诱变剂损伤的最有效方法是通过物理性防护使 DNA 分子免受直接攻击。以太阳的紫外辐射为例，其很难穿透人体组织，只有皮肤细胞和视网膜色素细胞是易受损伤的组织。皮肤依靠**角化细胞**内的**黑色素**保护自己，抵抗紫外辐射。这些黑色素由黑素细胞进入到表皮的角化细胞内（皮肤上皮层）（图 12.20）。



图 12.20 角化细胞核对于紫外辐射的物理防护 皮肤角化细胞对 UV、尤其是对 UVB 光子的防护，主要依赖表皮角化细胞中含有黑色素的黑色素体，它们是由黑素细胞转移到位于表皮基底层的角化细胞内的。此处显示，当角化细胞获得黑色素后，它们就组装为小伞/太阳伞的形状（有时也被称为细胞核上的帽），位于角化细胞核的上方（箭头所示），使细胞核免受可见光以及更为重要的 UVB 的辐射。缺失这种伞状结构的角化细胞与含这种伞状结构的角化细胞相比，UV 引起的 DNA 损伤会增加 4 倍。(Courtesy of D. E. Fisher.)

人类皮肤的颜色取决于从黑素细胞转移到角化细胞的黑色素的量。被广为引用的澳大利亚皮肤癌病例是这种色素沉着在肿瘤发病机制中作用的突出例证。在澳大利亚，高剂量的紫外辐射（由于邻近赤道）加上浅肤色人群（到最近为止大部分来自不列颠群岛）使这里成为全世界皮肤癌发生率最高的地区。相反，生活于非洲同一纬度的暗肤色人群则很少发生皮肤癌（在中非黑色素瘤比较少见，但没有色素沉着的脚底区却常发肿瘤）。至于 X 射线和宇宙射线，由于其可以轻易地穿过生物物质，因此人体对其并没有有效的物理防护措施。

机体抵抗物理致癌剂的方式是有限的。相比之下，机体可以通过多种机制在化学致癌剂尚未对细胞基因组造成损伤之前阻断其作用。一系列酶包括超氧化物歧化酶和过氧化氢酶，可以清除活性氧和自由基，它们协同作用将活性氧转化为无毒的非活性形式。活性氧也可以被一系列自由基清除剂清除，包括维生素 C、维生素 E、胆红素和尿酸盐。这些分子可以与活性氧发生化学反应，使其失去毒性。

另一条重要的防线是谷胱苷肽-巯基-转移酶类（GST），它们可使亲电化合物和许多致癌剂与谷胱苷肽相连接，从而使这些化合物先去毒性并以备进一步代谢和分泌。例如，有一种 GST 胱苷肽-巯基-转移酶 π（GST-π），可以使许多致癌剂脱毒（图 12.21A，B）。值得注意的是，有 90％的人类前列腺癌表现出 GST-π 表达的下调，由 *GSTP* 基因启动子区甲基化所致（图 12.21C），这也是肿瘤细胞下调多种抑癌基因表达

的一种机制（见 7.8 节）。人类许多其他肿瘤中也有 GST-π 失活的报道。GST-π 表达的丢失通常发生在肿瘤进展的早期，表明前列腺癌前细胞通过失活该基因获得了生长优势。因此，如果没有 GST 清除一些致癌因子，前列腺上皮细胞基因组将会受到致癌剂更多的攻击，其结果是突变率增加，从而很可能加速癌变的进程。

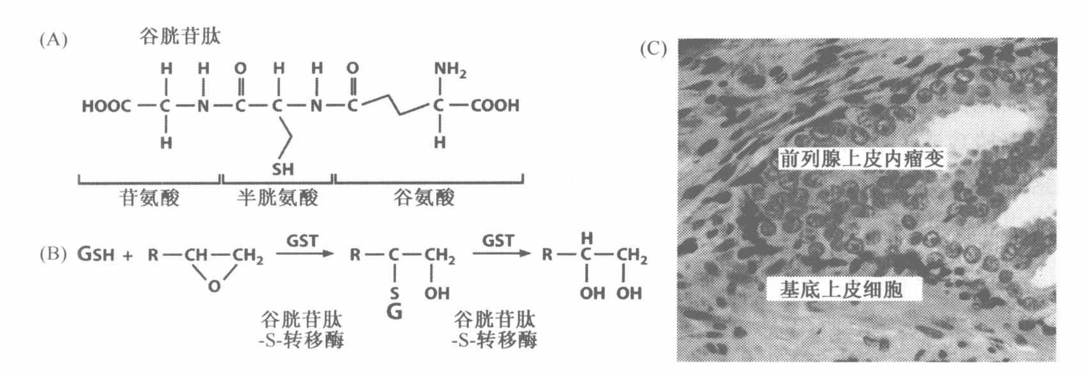


图 12.21　谷胱苷肽-S-转移酶及其在肿瘤中的丢失　（A）谷胱苷肽是一种不常见的三肽，谷氨酸通过羟基侧链与半胱氨酸的氨基相连。（B）谷胱苷肽-S-转移酶利用谷胱苷肽半胱氨酸残基上的巯基使许多活性化合物在与细胞内目标分子（如 DNA）作用前脱毒。此处显示的是由 GST 调节的一个典型反应，谷胱苷肽中的巯基用于去除被氧化化合物中的高活性环氧基团（R 代表任何的化学基团）。（C）高达 90%的前列腺癌显示一种非常重要的谷胱甘肽-S-转移酶 GST-π 表达的缺失，使得肿瘤细胞失去了对亲电性突变剂的解毒能力。在许多这种病例中，GST-π 表达的缺失源于 *GSTP1* 启动子的甲基化。利用 GST-π 抗体进行免疫组织化学分析，证明在 PIN（前列腺上皮内瘤变）损伤中，可以在基底上皮细胞中检测到 GST-π 的表达（左侧，深棕色），而管腔内上皮细胞（浅蓝色，右侧）中 GST-π 的表达已经全部丢失。腔内上皮细胞用核染色剂 DAPI 显示（蓝色）。（C，from C. Jeronimo，G. Varzim，R. Henrique et al.，Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 11：445-450，2002.）

流行病学的研究也提示了谷胱苷肽-巯基-转移酶与肿瘤易感性的关系。其中一项研究检测了正常对照人群和**脊髓发育不良**（MDS）综合征患者（表现为骨髓增生症，通常进展为急性髓性白血病）中两个独立的 GST 编码基因（称为 *GSTT1* 和 *GSTM1*）的等位基因型。在脊髓发育不良综合征中，46%的患者携带两个无效的 *GSTT1* 等位基因（不编码酶），这种遗传状态在正常人群中仅占 16%（而相关的 *GSTM1* 基因，纯合的无效等位基因在两组中比例相似）。分析表明，由遗传获得纯合无效 *GSTT1* 等位基因的个体，患脊髓发育不良综合征的风险比含有至少一个有功能等位基因的个体高出 4 倍。这些结果提示，谷胱苷肽-巯基-转移酶的 T1 同工酶以某种方式参与诱发脊髓发育不良综合征化合物的解毒过程。另一种解释是，在染色体上 *GSTT1* 基因与其邻近的另一基因紧密连锁，后者使个体对脊髓发育不良综合征有更高的易感性，尽管这种可能性较小，但目前很难将其排除。其他一些流行病学的研究也提示了致癌剂代谢与肿瘤风险的关系（信息栏 12.5）。

然而，这些针对攻击性诱变剂的精确化学防御并非总能保护基因组，其失败率取决于入侵诱变剂的化学性质和细胞产生的抵抗分子的水平，结果在细胞生命的每一天都会产生错误碱基。

信息栏 12.5　个体间致癌剂活化的差异可能影响患癌风险和治疗反应　细胞利用一系列酶采取各种化学方式修饰潜在的致癌剂，包括连接乙酰基、葡糖醛酸、谷胱苷肽和硫酸基团。许多这类化学修饰帮助细胞脱毒，并把潜在的有毒化合物包括致癌剂分泌到细胞外。由于人类基因组遗传的异质性，许多参与脱毒反应的酶的表达水平在不同个体间可能存在很大差异。这些差异可能导致个体对潜在致癌剂产生不同的生物学反应。例如，一项在416个肺癌患者和446个正常人中进行的研究发现，含有某种特定基因型的个体患肺癌的风险会增加2倍。这些易感个体含有一个特殊的细胞色素编码基因 *CyplA1* 的等位基因，并且伴随 *GSTMl* 基因的缺失。

另一项研究关注的是一类患乳腺癌的妇女，这些妇女每天通过饮食摄入超过27ng的杂环胺类物质（2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline,图12.19A)，特别是烤肉中这类物质含量丰富。据报道，与饮食中含有低水平 MeIQx 的病例相比，*N*-乙酰基转移酶1高表达（NAT1，一种可将杂环胺转化为活性突变剂的酶）的妇女患乳腺癌的概率会增加6倍，而 *N*-乙酰基转移酶1低表达的妇女仅仅增加2倍风险。该结果提示，这些酶以两种方式影响肿瘤的发生率：一些酶可影响许多潜在致突变化合物的脱毒速率，而另一些酶可将非活性化合物转化为具有化学活性的诱变剂。

事实上，这些酶还在癌症中发挥着其他作用，因为它们可使化疗药物脱毒，从而削弱治疗的效果。在比较携带 *GSTMl* 和 *GSTT1* 功能性等位基因的乳腺癌患者和二者纯合性缺失的患者的临床反应时，观察到了这些酶对肿瘤治疗效果的显著影响。所有这些妇女都用化疗（环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶）与放疗相结合的方法，具有功能性 *GSTMl* 和 *GSTT1* 等位基因的乳腺癌患者，在治疗后6年内全部死亡。相反，两个等位基因位点均缺失的患者，有2/3治疗8年后仍存活。

本信息栏中提到的所有病例中不同的反应都与特异性等位基因相关，但仅仅是相关，并无证据证明有因果关系。理论上被研究的等位基因很可能与其他等位基因连锁，而后者才是患者药物反应性增加和降低的真正原因。

对于致癌剂活化的讨论不可避免地引出了另一个问题：如果细胞内的许多活化酶（如细胞色素）本质上可中和或使致癌物脱毒，那么人体各种组织必须与之斗争的化合物的来源和每天的负荷是什么？在这些致癌物中，人造致癌剂对这种负荷是否起主要作用（信息栏 12.6)？

信息栏 12.6　人造诱变剂也能引起肿瘤吗　对于空气和食物链中的人造诱变剂（特别是合成的有机化合物）的激烈争论已经持续了半个世纪，迄今仍未停止。其中许多争论的焦点是食物链的痕量污染问题，特别是杀虫剂及其进入人体后代谢激活成为潜在诱变剂和致癌剂的可能性。Bruce Ames 利用 Ames 检测，认为人每天通过摄入食物会接触5000～10 000种不同的天然化合物及其代谢产物，其中有2000mg燃烧残留物（高温烹饪各种食品后的产物）和1500mg杀虫剂（用以保护植物免受昆虫的危害）。相反，每天对残留于食物链的合成杀虫剂的暴露量为0.1mg。在实验室用标准方法检测时发现，大约一半的植物杀虫剂具有致癌性。在用啮齿动物进行的实验中发现，合成杀虫剂很可能与随机选择的天然来源的化合物一样是致癌剂。植物来源化合物，如我们吃的蔬菜中的化合物，通常认为是安全的。食物链中的人造污染物的浓度比天然植物化合物（同样具有致癌性）低多个数量级，这个现象引出一个问题，人工杀虫剂是否与西方人群肿瘤发病人数有关。除了香烟燃烧产物和高温烹调食物的产物之外，其他人工化合物在肿瘤中的作用可能仅限于那些经常接触和接触浓度很高的职业人群中，如经常接触大量杀虫剂的农民。

12.8 修复酶修复被诱变剂改变的DNA

如果有毒化合物在攻击DNA前没有被阻止，哺乳动物细胞也有一种修复机制可以将该致癌剂引起的损伤降到最低。细胞内存在一个非常精密的DNA修复系统，随时监测基因组的完整性，清除和替换由于化学和物理因素攻击产生的错配碱基。这个系统中的成分也负责连接复制过程中偶尔出现的或由基因毒性试剂引起的双螺旋断裂。哺乳动物细胞会产生几百种不同的蛋白质以保证DNA的损伤不会遗传到子代细胞。其中一些DNA修复蛋白在肿瘤发生中起很大作用，因为这些蛋白的缺陷可导致突变频率增加，进而加速肿瘤的进展。

细胞产生一系列可恢复正常DNA结构的酶。重要的是，它们的功能不同于上文（12.4节）提到的错配修复酶（MMR），因为MMR修复的是结构正常但掺入到错误位置的核苷酸，而此处讨论的修复机制是针对化学结构异常的核苷酸。

恢复发生化学改变的DNA结构的最简单的策略是酶催化产生错误碱基的逆反应。例如，一种DNA烷基转移酶可以去掉鸟嘌呤O^6位上的甲基和乙基加合物，从而恢复正常碱基的结构（图12.22A和B）。有研究报道，MGMT（O^6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶，也称DNA烷基转移酶）在某些肿瘤的发展中起重要作用，在高达40%的神经胶质瘤和结肠癌、25%的非小细胞肉瘤、淋巴瘤和头颈部肿瘤中存在启动子甲基化引起的*MGMT*基因的沉默（相反，在其他大部分类型肿瘤中尚未检测到该基因启动子的甲基化现象）。与解毒基因（如前面讨论的谷胱甘肽-巯基-转移酶基因）的情况一样，我们推测某些组织中出现的这种DNA修复功能缺失可能会增加突变频率进而加速肿瘤进展。当用转基因的方法使MGMT基因在小鼠乳腺和胸腺中过表达时，可使这些腺体具有很强的抗*N*-甲基-*N*-亚硝基脲（一种烷基化诱变剂）致癌能力，野生型小鼠（$Mgmt^+$）很容易患胸腺淋巴瘤，而在胚系细胞内转入了*MGMT*基因，*MGMT*过表达的转基因小鼠（MgmP $MGMT^+$）对该致癌剂的作用有很强的抵抗力。

在一些动物肿瘤模型中，某些致癌剂引起的肿瘤类型会受到分布于各种组织中的特定DNA修复类型的影响，并且很可能在人类中也是如此（信息栏12.7）。而且，与谷胱苷肽-S-转移酶（信息栏12.5）类似，这些DNA修复酶能影响治疗反应。例如，一组MGMT酶高表达的恶性胶质瘤患者，用烷化剂治疗后生存期为12个月；同一队列中另一组MGMT低表达患者的生存期为22个月，几乎是前者的2倍。这个结果表明，高水平的MGMT酶可以非常有效的清除化疗药物产生的烷基，从而中和其作用。

信息栏12.7 修复酶的表达模式解释某些组织特异性易感的肿瘤 哺乳动物细胞看来仅表达单一的MGMT酶，该酶的活性对致癌性的重要影响已被实验证实。实验中用*N*-乙基亚硝基脲（ENU）处理怀孕15天的大鼠，所有的大鼠幼崽在出生几个月后均出现起源于中枢神经系统的神经外胚层肿瘤。ENU诱导肿瘤的这种特殊能力是由于MGMT酶显著表达于发育中的胚胎和新生幼崽的全身，但在中枢神经系统表达最少。因此，神经系统细胞内形成的烷基化鸟嘌呤残基持续存在而不是被快速清除，最终产生点突变，这些点突变与导致肿瘤发生的癌基因的活化有关。在一个用新生大鼠进行的实验中，使其在母体子宫内暴露于ENU或相关的烷化剂MNU（*N*-methylni-trosourea）一周后，鼠脑组织DNA中活性O^6-烷基加合物的浓度分别是肝脏DNA中的20倍和90倍。

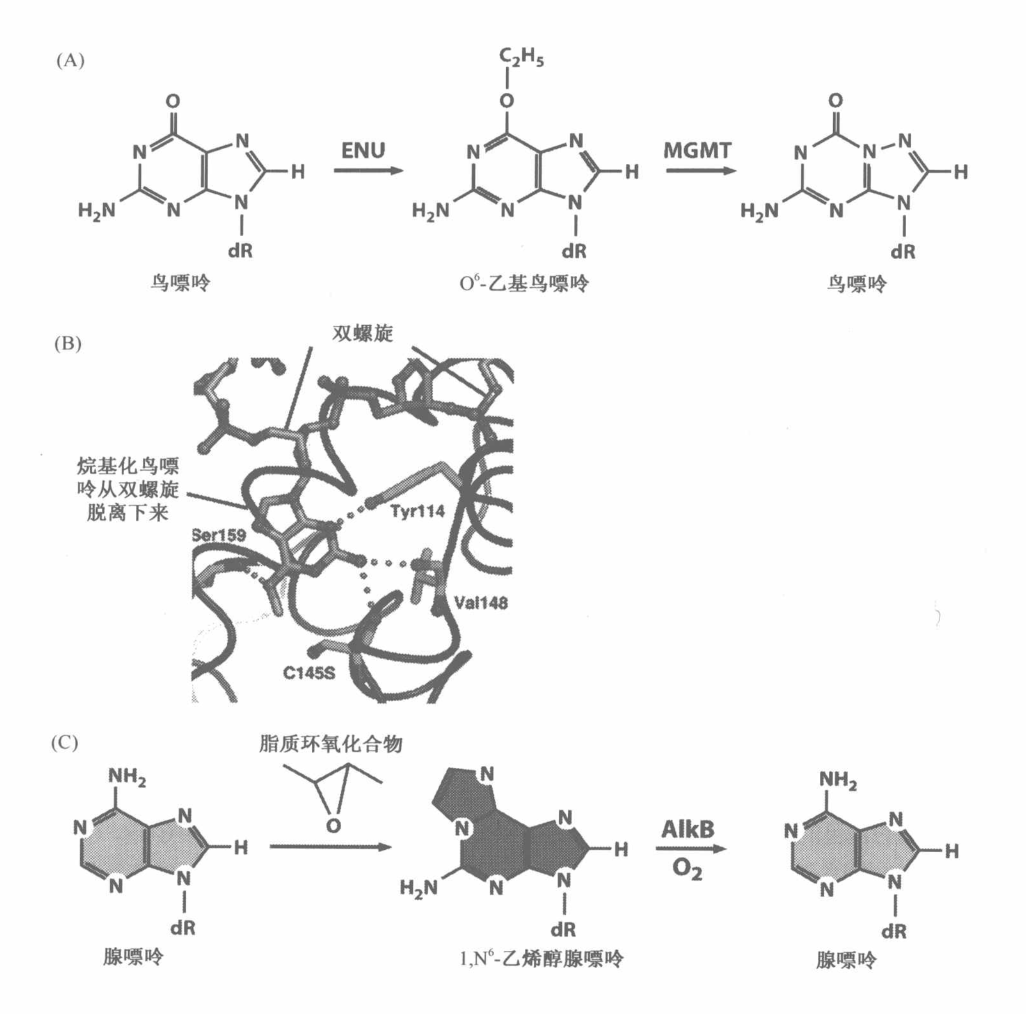


图 12.22 通过去乙酰化修复酶恢复正常碱基结构 (A) 鸟嘌呤 O^6 位易受乙酰化试剂如 ENU 的攻击。O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶（MGMT）也被称为 O^6-乙酰基鸟嘌呤 DNA 乙酰基转移酶（AGT）。与许多从 DNA 中切除改变的碱基或含有这些碱基的全部核苷酸的 DNA 修复酶不同，MGMT 是通过使改变的鸟嘌呤恢复为正常结构而进行 DNA 修复，即从鸟嘌呤 O^6 位移除乙酰基。如果该修复机制发生缺陷，乙酰化的鸟嘌呤会导致 G 到 A 的突变。(B) 对 DNA 修复蛋白的结构分析揭示了这些蛋白发挥功能的多种方式。结构分析和酶学分析揭示 MGMT（下面，浅蓝和蓝黑色）在移除乙酰基前先将受损碱基（蓝色，橙色）调整到双链结构的外侧（上面，橙色和淡紫色）。而且酶和底物的反应是定量的，反应中活性位点 145（C 145S）位半胱氨酸残基随着正常鸟嘌呤结构的恢复被不可逆地乙酰化；因此，每个酶分子仅能使单个乙酰化的脱氧鸟嘌呤去乙酰化。(C) 高活性的类脂过氧化物，通常分布于有炎症的组织中，能够攻击和修饰腺嘌呤（如图所示）和其他 DNA 碱基。大肠杆菌 AlKB 酶能清除生成的加合物和简单的甲基加合物。如图 12.14C 所示；AlKB 同源物在人类细胞中具有相似的作用。(A，from S. L. Gerson，Nat. Rev. Cancer 4：296-307，2004；B，from D. S. Daniels，T. T. Woo，K. X. Loo et al.，Nat Struct. Mol. Biol. 11：714-720，2004.)

上述的 MGMT 系统只是细胞处理甲基化碱基的一种方式，还有另一种处理方式，涉及大肠杆菌 AlkB DNA 修复蛋白的同源物，通过氧化连接到 DNA 碱基上的甲基基团从而发挥作用，氧化的甲基以甲醛的形式从四种 DNA 碱基环上脱落。同样，AlkB 酶可以使大的乙基基团以乙醛的形式释放。一种比较夸张的解释是这种酶燃烧掉了不想要的甲基基团！如前所述，S-腺苷甲硫氨酸引起的 DNA 碱基的甲基化在细胞生命过程中经常发生，该甲基供体经常参与细胞中许多分子的生物合成；其高活性甲基基团偶尔可转移到细胞内大分子上使其甲基化，包括 DNA 碱基。

大肠杆菌的 AlkB 酶（及其哺乳动物同源物）也可以移除许多碱基加合物。例如，炎症组织中不饱和磷脂不可逆的氧化率很高，进而产生磷脂过氧化物。这些高活性的过氧化物可与 DNA 碱基产生复杂的具有高致癌性的化合物（图 12.22C）。确实，在溃疡性结肠炎患者组织中发现了这类化合物，这种疾病进展为肿瘤的概率很大（见信息栏 11.13）。人体组织中的 AlkB 同源物 hABH2 和 hABH3 在肿瘤病理中的作用还没有被阐明。

比去烷基化酶更重要的是许多细胞内识别 DNA 碱基化学性质改变的酶，这些酶的识别依赖于 DNA 的特殊修饰，通常通过两种方式做出反应。在一些情况下，特异性的酶可以使脱氧核糖和修饰碱基之间的化学键断裂，该过程被称为**碱基切除修复**（BER；图 12.23A）。其他情况下，全部的核苷酸包括碱基和相连的脱氧核糖一起被切掉，此称为**核苷酸切除修复**（NER；图 12.23B）。

碱基切除修复（BER）倾向于修复内源因素引起的 DNA 损伤，如活性氧系列和前面提到的脱嘌呤事件引起的 DNA 损伤（12.5 节）。相反，核苷酸切除修复（NER）发生于外源事件引起的 DNA 损伤，如紫外线和化学致癌剂（图 12.17 和图 12.18）。碱基切除修复主要作用于 DNA 双螺旋结构没有改变的损伤，而核苷酸切除修复则作用于 DNA 双螺旋结构发生变化的损伤。

碱基切除修复是由一组 DNA **糖基化酶**起始的，每种酶特异性识别一种异常碱基并且切断其与脱氧核糖核酸之间的共价键。如 DNA 中的尿嘧啶碱基可以被负责碱基切除修复的蛋白识别，因为尿嘧啶碱基在 DNA 中出现是不正常的。尿嘧啶被尿嘧啶 DNA 糖基化酶清除，并迅速被胞嘧啶替换（图 12.11B，DNA 中尿嘧啶的出现是胞嘧啶自发的去氨基化的结果）。然而，在 DNA 不恰当的位置上出现胸腺嘧啶给这些修复酶带来了很大的困难，因为胸腺嘧啶是 DNA 的正常组分。我们已经知道，5-甲基-胞嘧啶偶尔会发生自发脱氨基过程，变为胸腺嘧啶，从而形成 TG 碱基对（图 12.11B）。事实上，为应对该问题，生物进化已在我们的细胞内创造了 T∶G 糖基化酶，该酶特异性修复与 G 配对的 T。尽管如此，由脱氨基作用形成的 T∶G 碱基对，偶尔也能逃避该酶的检测，持续地产生点突变。

当 DNA 糖基化酶把异常碱基去除以后，无碱基的核糖会被无嘌呤无嘧啶内切核酸酶（APE）切掉。该酶在糖的 5′端特异性切割携带无碱基脱氧核糖核酸的链；另一种酶，即 AP 裂解酶在 3′端切割释放无碱基的糖。DNA 上产生的单链缺口由 DNA **聚合酶**修复，通常是聚合酶 β。产生的单链切口通过 DNA 连接酶在相邻核苷酸间形成磷酸二酯键而闭合，最后重建了正常 DNA 的化学结构。偶尔出现的碱基切除修复的变异形式是“长片段修复”，参与损伤碱基附近 4～7 个碱基的切除，然后再补满这个缺口。

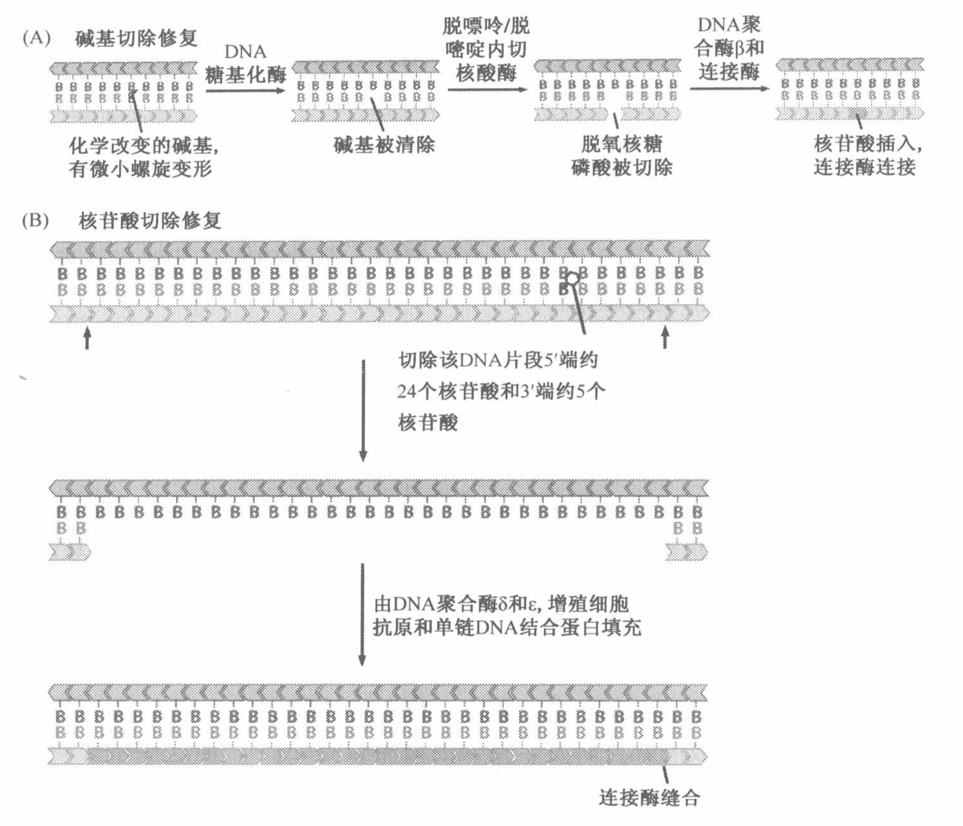


图 12.23 碱基和核苷酸切除修复 (A) 碱基切除修复（BER）是酶通过识别有螺旋扭曲改变的碱基来完成的。DNA 糖基化酶将连接改变碱基和脱氧核糖的糖键断开。无碱基的脱氧核糖磷酸被脱嘌呤/脱嘧啶内切核酸酶特异性切除。剩余的单核苷酸缺口被 DNA 聚合酶 β 填充，然后由 DNA 连接酶缝合。(B) 核苷酸切除修复（NER）中酶识别大的螺旋扭曲损伤，然后将扭曲区域 5′端约 24 个核苷酸和 3′端约 5 个核苷酸切除。产生的约 29 个核苷酸单链缺口被 DNA 聚合酶 δ 和 ε 填充，与增殖细胞核抗原和单链 DNA 结合蛋白一起修复缺口，然后由 DNA 连接酶缝合。回文结构代表脱氧核糖核苷酸，图中所有情况下均表示 5′→3′方向。

核苷酸切除修复（图 12.23B）是由一个大的蛋白质复合体完成的，该复合体包含 24 个亚单位。只有 DNA 发生两个独立的变异时才会启动该复合体进行修复，即当正常的双螺旋结构发生显著变形且同时存在发生化学变化的碱基。一旦该复合体发现异常，就会切掉损伤链上游和下游的损伤部位，产生 25～30 个核苷酸长度的单链片段，然后该单链片段被去除。DNA 聚合酶以未损伤链为模板，按照互补原则，特异性地补满产生的缺口，然后由 DNA 连接酶去除最后的损伤痕迹。

核苷酸切除修复酶是那些能够识别和移除大量碱基错误形成的特殊结构（如与碱基共价结合的复杂分子结构）的酶，这些结构异常可由内源性诱变剂如多环化合物、异环氨基酸和黄曲霉素 B1 引起，也包括紫外辐射形成的嘧啶二聚体。例如，在紫外辐射后，培养细胞在 24h 内能修复大约 80%的嘧啶二聚体。核苷酸修复装置在嘧啶二聚体的 3′端去除 5 个核苷酸，在 5′端去除 24 个碱基。

构成核苷酸切除修复的多个反应可以分为两种亚型：第一种反应特异性作用于具有

转录活性的模板链，并与负责转录过程中延伸这些模板链的 RNA 聚合酶分子协同作用，这种反应被称为转录偶联修复（TCR）；第二种负责其余的基因组修复，包括转录基因的非模板链和基因组的非转录区域，因而有时被称为全基因组修复（GGR）。抑癌基因 *p53* 编码蛋白可以激活许多在 GGR 过程中发挥作用的核苷酸切除修复蛋白编码基因的表达，这也是 *p53* 突变细胞中存在 GGR 缺陷的原因；相反，转录偶联修复在这些细胞中是完整的。TCR 和 GGR 的区别提示，在发生 *p53* 突变的人类肿瘤中，有一半可以维持细胞基因组的稳定性（第 9 章）。其余肿瘤中 p53 的功能以其他方式进行补偿，但在全基因组修复方面可能仍有缺陷。

细胞处理损伤 DNA 的另一种策略（实际上是一种绝望的行为）是对仍未被修复的模板 DNA 链进行复制，称为错误倾向 DNA 复制。此处的复制装置在遇到仍然损伤的碱基时必须判断到底四种碱基中的哪一种适合插入到正在延伸的 DNA 链上，而这种判断并不总是正确，因此经常导致碱基的错误掺入（图 12.24）。

迄今为止，发现了至少 9 种不同的哺乳动物错误倾向 DNA 聚合酶。其中有些酶可以在模板链上碱基缺失的情况下，在延伸链的互补位置掺入一个核苷酸。而其他酶可以利用另外的 DNA 聚合酶错误掺入的核苷酸为引物延伸新生的 DNA 链。第三种类型的酶可以在互补链上相应碱基带有复杂基团时，如共价结合的未被核苷酸切除修复系统去除的 DNA，仍然可以掺入一个碱基。其中一个酶由 *XPV* 基因编码，可高度特异性地识别由 UV 辐射产生的 T-T 胸腺嘧啶二聚体，并在互补链上插入两个 A（图 12.24）。尽管细胞中负责 DNA 合成的聚合酶发生错误的概率仅是 10^{-5}，但这些错误倾向 DNA 聚合酶发生错误的频率则高达每复制 100 个碱基会有一个错误掺入。

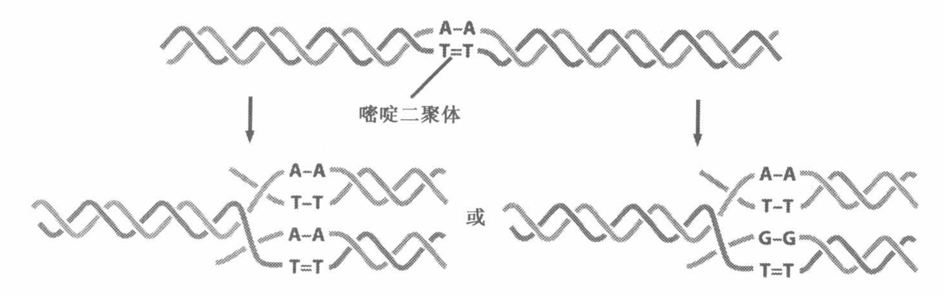


图 12.24　错误-倾向修复　错误倾向 DNA 合成发生在 DNA 复制叉前进过程中遇到一个尚未修复的 DNA 损伤时，如图所示的胸腺嘧啶二聚体。在大多数情况下（左侧），错误倾向 DNA 聚合酶（有时称为旁路聚合酶）被募集，通过在延伸的 DNA 链上（绿色）插入合适的碱基（如 A-A 双核苷酸）从而修复损伤的模板链（红色）。但是，有时候（右侧）错误倾向 DNA 聚合酶不能正确推测模板链上的错误结构，反而将G-G二聚体核苷酸掺入胸腺嘧啶二聚体的互补位置上。

错误倾向聚合酶引起的错误可能在细胞基因组中产生不可接受的高频突变。然而，积累这些突变付出的代价应与另一种选择进行权衡，即由于 DNA 难于复制的损伤使 DNA 复制叉停滞，从而使细胞面临即将死亡的风险。

研究最充分的错误倾向聚合酶是 DNA 聚合酶 β（pol-β），该酶通常参与替换由碱基切除修复去除的核苷酸。这种相对较小的聚合酶分子缺乏大聚合酶的校对功能（信息栏 12.4），此种功能缺失可以用来解释大部分 DNA 复制的易错现象。在各种卵巢癌细胞

系中，该酶呈现 10 倍的高表达。易错 DNA 聚合酶的过表达可能是这些肿瘤细胞增加突变，加速肿瘤进展的一种有效策略。在培养的人成纤维细胞中过表达聚合酶 β 可以增加微卫星不稳定性，并使总的突变率提高 3 倍，从而支持了上述观点。

细胞一旦动用错误倾向聚合酶，就表示这一细胞已经处于绝境：其冒险将错误掺入碱基作为避免死亡的一种可以接受的方法，接下来不可避免地会导致 DNA 复制的失败。实际上，至少有一种哺乳动物基因组编码的酶有目的性地将突变掺入基因组中，这种酶也可能参与肿瘤的发生（补充材料 21 ◎）。

12.9 核苷酸切除修复、碱基切除修复和错配修复的遗传缺陷导致特定的癌症易感综合征

1874 年，两名澳裔匈牙利内科医生 Ferdinand Hebra 和 Moritz Kaposi，描述了一种与皮肤鳞状和基底细胞癌高频发生相关的罕见综合征，Kaposi 随后以其名字命名了这种肉瘤。随着研究越来越清楚，人们发现受累个体对 UV 射线极其敏感，仅仅是很少量的阳光照射就会使婴儿的皮肤受到严重的灼伤（补充材料 22 ◎）。这些个体出现干燥的羊皮纸样皮肤（着色性干皮病）和许多雀斑（图 12.25）。着色性干皮病（XP）患者比一般人患皮肤癌的风险高 1000 倍，患舌尖鳞状细胞癌的风险高 100 000倍。儿童患皮肤癌的平均年龄为 8 岁，而在正常人群中患皮肤癌的年龄一般为 50 岁。

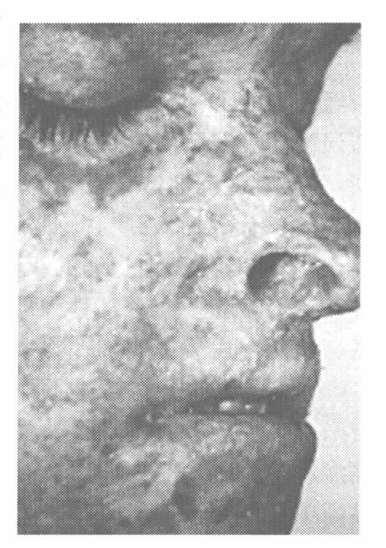


图 12.25 着色性干皮病患者 着色性干皮病患者所有暴露于阳光的皮肤部位都有严重而广泛的损伤。这些病变可以发展为鳞状和基底细胞癌和黑色素瘤。这些肿瘤的发生率比正常人群要高 1000 倍。(Courtesy of K，H. Kraemer.)

现在知道有 8 个基因与 XP 相关，其中任何一个发生遗传缺陷都可能导致着色干皮病。这一综合征的遗传复杂性最早是通过体细胞遗传学发现的。将两个不同 XP 患者的细胞在体外培养条件下融合，研究杂合细胞的修复表型（图 12.26）。在很多情况下，杂合体可以正常修复 DNA，表明两个母细胞分别携带与两个不同基因有关的 DNA 修复缺陷。例如，运用后来发展的命名法，发现来自 *XPA* 基因突变个体（同时具有一个野生型 *XPC* 基因）的细胞与 *XPC* 基因突变个体（同时具有一个野生型 *XPA* 基因）的细胞融合后能够正常修复 DNA。这一协同作用，或者“遗传互补”作用可将 XP 相关的突变等位基因分为 8 个不同的互补群，每一组根据关键基因的特征命名。仅仅在几年之后，关键基因就通过分子克隆被分离出来了。这很可能说明，受累个体遗传了一个基因的两个突变的无效等位基因，代表了另一个 XP 互补群体。

8 个 XP 相关基因中的 7 个，分别被命名为 *XPA*～*XPG*，编码的蛋白作为大的多蛋白核苷酸切除修复复合体（NER）的组分起作用。第八个基因，*XPV* 为错误倾向 DNA 聚合酶 η（pol-η）。当细胞通常使用的 DNA 聚合酶（如 DNA 聚合酶 δ）不能复制

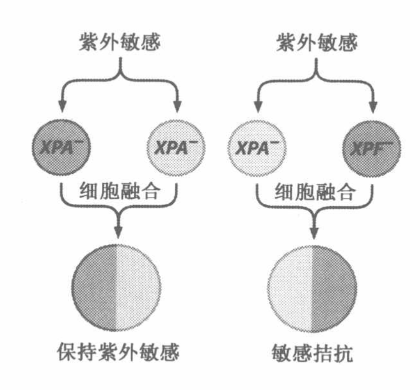


图 12.26 着色性干皮病互补群的发现 着色性干皮患者的细胞融合实验揭示，来自不同患者的成纤维细胞（深蓝色，浅蓝色，左侧）融合后会产生杂交的四倍体细胞，具有与母体细胞相同的紫外线敏感性。然而在其他的情况下（右侧），两个患者的细胞融合（淡绿色，淡红色），产生的杂交细胞具有与正常个体细胞一样的抗紫外线杀伤作用的能力。这个结果使不能互补 DNA 修复缺陷的成对细胞被分配到同一个互补群，很显然是因为这两个群携带同一个基因的突变。相反，通过其他配对细胞（淡绿色，淡红色）的成功互补允许各自的母细胞型细胞被分配到两个不同的互补群中，说明在着色性干皮病进展过程中至少有两个不同基因发生等位基因突变。最终以这种方式确定了 8 种不同的着色性干皮病互补人群。几年后，每个互补群中的关键基因分别通过基因克隆被分离。

未经修复的 DNA 损伤，如嘧啶二聚体时，就会动用 DNA 聚合酶 η。如上一节提到的，错误倾向聚合酶（有时被称为**旁路聚合酶**）能够复制包含仍未修复的 T-T 二聚体的 DNA 模板链，通常在互补链合成两个 G。一般认为 pol-η 是很准确的，95%的时间它可将 AA 核苷酸掺入到与 TT 相对的延伸链。

XP 患者患其他疾病的风险也升高，特别是神经系统疾病，18%的 XP 患者出现这种病变。敲除一个 *XP* 基因的小鼠在受到化学致癌物的作用后对肿瘤的易感性显著提高。这两个发现证明，一些 *XP* 基因编码的核苷酸切除修复系统中的成员除了可以修复 UV 射线造成的损伤外，还可修复其他致癌物引起的遗传损伤，这是意料之中的。这又带来了以下问题：为什么缺失一个或另一个 *XP* 基因的个体，其内部器官具有相对低的癌症风险，即使是 NER 复合体中的一个重要成员在人体的所有细胞中缺失也是这样？最简单且可能正确的解释是，迄今为止，UV 射线是大多数人都暴露的最重要的环境诱变剂，因此也是需要 NER 机制修复的大多数损伤的主要来源。

一些其他的遗传综合征也与 NER 的缺陷有关。例如，Cockayne 综合征（CS）患者，其体内与转录偶联的 NER 相关的两个基因中的一个有缺陷。他们的细胞具有与 XP 患者细胞相似的高光敏感性。死于这一疾病的患者平均年龄是 12 岁。少数活过青春期的患者并没有显示出癌症发病率的升高。目前还不清楚，携带有一个杂合型 XP-或 Cockayne 综合征相关突变等位基因的个体患特定类型癌症的风险是否会升高。

XP 仅仅是第一个被发现的由多种 DNA 修复遗传缺陷造成的许多人类癌症易感综合征之一（表 12.1）。这里我们将介绍另一个遗传性非息肉结肠癌（HNPCC）。HNPCC 是一种家族性癌症综合征，对结肠癌而言是一种很普遍的遗传易感体质，导致发生 2%～3%的结肠癌。正如其名，HNPCC 不同于我们前面提到的另一种类型的遗传性结肠癌易感体质——腺瘤状息肉结肠（7.11 节）。患有一种 HNPCC 亚型的患者除结肠癌外，还对子宫内膜、胃、卵巢和尿路系统癌症具有较高的易感性。

表 12.1　遗传性 DNA 修复缺陷引起的人类家族性肿瘤综合征

综合征名称	基因名	肿瘤表型	受累的酶及过程
遗传性非息肉性结肠直肠癌	(4-5 个基因)[a]	结肠息肉	错配修复酶
着色性干皮病[b]	(8 个基因)[b]	紫外线诱导的皮肤癌	核苷酸切除修复
运动失调性毛细血管扩张症[c]	*ATM*	白血病，淋巴瘤	双链 DNA 断裂
类运动失调性毛细血管扩张症综合征[c]	*MRE11*	未确定	NHEJ 参与的双链 DNA 修复
家族性乳腺，卵巢癌	*BRCA1*，*BRCA2*[d]	乳腺癌，卵巢癌	双链 DNA 断裂的同源直接修复
Werner 综合征	*WRN*	一些肿瘤	核酸外切酶和 DNA 解旋酶[e]，复制
Bloom 综合征	*BLM*	实体肿瘤	DNA 解旋酶，复制
Fanconi 综合征	(9 个基因)[f]	急性髓细胞样白血病，头颈部鳞状细胞癌	DNA 交联修复和双链 DNA 断裂
Nijmegen 断裂综合征[g]	*NBS*	大多数淋巴瘤	NHEJ 参与的双链 DNA 修复
Li-Fraumeni 综合征	*TP53*	多种肿瘤	DNA 损伤警示蛋白
Li-Fraumeni 综合征	*CHK2*	结肠，乳腺	DNA 损伤信号转导中激酶

a 5 个不同的错配修复酶基因以突变等位基因的方式在人类生殖种系中传递。其中两个错配修复基因 *MSH2* 和 *MLH1* 通常出现在遗传性非息肉性结肠直肠癌；另两个错配修复基因——*MSH6* 和 *PMS2* 仅在小部分病例中出现；第 5 个基因 *PMS1* 可能涉及一小部分病例。

b 着色性干皮病，至少有 8 个不同基因，其中 7 个参与核苷酸切除修复。这 7 个基因命名从 *XPA* 到 *XPG*，第 8 个基因 *XPV* 编码 DNA 聚合酶 η。

c 运动失调性毛细血管扩张症，占很小比例。

d 突变的生殖系等位基因 *BRCA1* 和 *BRCA2* 存在于 10%～20%已鉴定的人类家族性乳腺癌中。

e 核酸外切酶从一端向内消化 DNA 或 RNA；DNA 解旋酶展开双链 DNA 分子。

f 9 个基因已经被克隆，并且至少 11 个互补基团被证明。互补基团 J 编码 BRCA1 的伴侣蛋白——BACH1。

g NBS1 蛋白（nibrin）与 Rad50 和 Mre11 形成一个复合体，所有这些成分均参与双链 DNA 断裂的修复。患者表现 Nijmegen 断裂综合征与运动失调性毛细血管扩张症相似但不完全相同。

部分改编自 B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002；and from E. R. Fearon，Science 278：1043-1050，1997.

HNPCC 患者的高肿瘤易感性可以追溯到其结肠中肿瘤进展速率的增加：腺癌在普通人群中的发展进程需要 8～10 年，而 HNPCC 患者细胞的遗传不稳定性会使这一进程缩短至 2～3 年。实际上，由于他们的腺瘤进展为癌症的速度如此之快，癌前病变的时间比较短，因此很少在这些患者的结肠中发现癌前病变。

绝大多数 HNPCC 病例是由编码两种重要的错配修复蛋白 MSH2 和 MLH1 的基因发生胚系突变造成的（信息栏 12.8），另两个 *MMR* 基因 *MSH6* 和 *PMS2* 的胚系突变只参与小部分结肠癌的发生。但是，还有两个在 DNA 修复中同样起重要作用的 MMR 相关基因（*PMS1*、*MSH3*）却极少发生种系突变。与很多抑癌基因的遗传学相同，患者仅遗传一个有缺陷的 *MMR* 等位基因，这样的患者发生癌症时几乎所有的肿瘤细胞总是发生杂合性丢失（LOH），使 *MMR* 基因的活性野生型拷贝丢失。

信息栏 12.8　细菌、酵母、人类遗传学的趋同现象导致遗传性非息肉性结直肠癌（HNPCC）基因的发现　发现 HNPCC 遗传基础的途径非常引人注目。通过分析多个患有该综合征家族的遗传易感性及分散于人类基因组中的染色体标记在这些家族中的遗传情况，遗传学家发现了两个不同的与该病密切相关的遗传区域。在一些家族中，疾病易感性与人类染色体 2p16 上的遗传标记共分离。而在另一些家族中，这种易感性似乎与染色体 3p21 上的遗传标记共遗传。

同时，对一些散发的结肠癌中遗传异常的细致观察发现，A 重复序列（如 A7）在结肠癌细胞的基因组中经常缩短或延长（被 A6 或者 A8 取代）。随后，发现了更复杂的微卫星序列［如 $(CA)_8$］有缩短或延长现象（12.4 节）。这种微卫星不稳定的情况在 HNPCC 结肠癌患者的细胞中十分普遍。

有研究者发现，这种 DNA 序列的变化与存在 *mutS* 和 *mutL* 基因（参与错配修复）突变的 *E. coli* 中快速积累的改变极其相似。酵母中 *mutS* 和 *mutL* 同源基因的突变也引起相似的基因组异常。正是这种相似性使得一些科学家想证明，HNPCC 患者中这些基因或者其他一些参与错配修复的基因的同源基因是否也受到了影响，很快这点就得到了证实。确实，人类 *mutS* 的同源基因（*hMSH2*）定位于 2p16，而人类 *mutL* 同源基因定位于 3p21。最终，发现一些 HNPCC 家族成员遗传 *hMSH2* 等位基因突变，而在另一种 HNPCC 家族成员中存在 *hMLH1* 等位基因突变。

细胞失去发现和修复序列错配的能力将导致含有微卫星重复序列基因的突变率增加。关于这种修复缺陷的后果，早期一个生动的例子是对 11 个存在微卫星不稳定的结直肠癌细胞系进行的研究。在这 11 个细胞系中，发现有 9 个存在 II 型 TGF-β 受体（TGF-β RII）编码基因的突变。特别是该基因的野生型可读框中有由连续 10 个腺嘌呤核苷酸组成的序列（A′s）（图 12.27），而在这 9 个细胞系中，TGF-βRII 基因丢失了该 A′s 聚合体中的一个或两个腺嘌呤核苷酸。这种改变使 TGF-βRII 基因的编码序列可读框发生变化，生成没有功能的 TGF-βRII 蛋白。

可以想象，一旦肿瘤前体细胞不再表达 TGF-βRII，它们将逃避这个抗分裂原分子（TGF）的生长抑制作用（8.4 节）。如果在肿瘤进展的早期上皮细胞获得这种特性，将会是一种极大的优势。在随后的对 110 例有微卫星不稳定的结肠癌病例进行的研究中发现，其中 100 例携带有突变的、有缺陷的 TGF-βRII 等位基因，而且几乎所有的突变的等位基因都以纯合的形式存在。因此，一旦一个受体编码基因发生失活突变，另外一个残存的野生型等位基因也将发生杂合性丢失。

后来，在存在错配修复缺陷的癌细胞中发现其他基因也有类似的突变（表 12.2），表 12.2 所列的大部分 MMR 缺陷及其引起的等位基因突变是在散发性（非家族性）肿瘤中发现的。这些发现说明在非家族性肿瘤中，*MMR* 基因像抑癌基因一样，可通过体细胞突变或者启动子甲基化导致转录沉默（7.8 节）而失活。事实上，这些肿瘤中第二种机制较为普遍：大约 15%的散发型胃癌、结直肠癌和子宫内膜癌中存在 *MMR* 的缺陷，而且几乎在所有这些肿瘤中，微卫星不稳定的现象均归因于甲基化，从而导致 *MLH1* 基因的沉默。有趣的是，在与 *MMR* 缺陷肿瘤邻近的正常子宫内膜组织中，发现 *MLH1* 基因经常被甲基化，说明甲基化是这一组织中肿瘤进展的早期事件之一（图 12.28）。

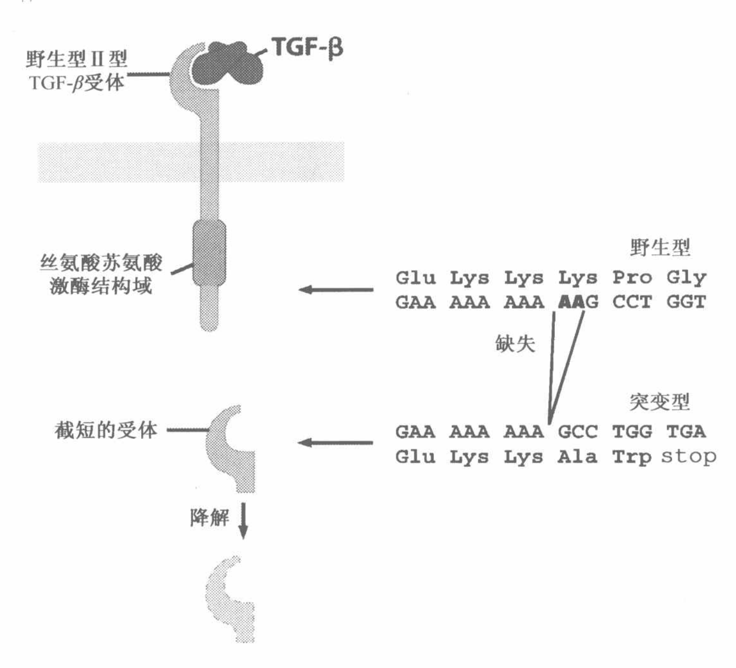


图 12.27 微卫星不稳定性影响II型TGF-β受体基因 II型TGF-β受体（TGF-β RII）在有微卫星不稳定性并存在错配修复（MMR）缺陷的人类结肠癌中经常失活。我们这里分析的特定病例的DNA序列中，十腺嘌呤核苷酸序列中最后的两个腺嘌呤核苷酸（黑体）在受体编码基因的可读框中缺失，显然是由MMR缺陷造成的。这种特定的A10→A8的缺失导致无义突变，造成II型TGF-β受体蛋白翻译过程的提前终止，并因此失去了C端关键的信号结构域，这种缺失使结肠癌细胞前体对TGF-β的生长抑制作用产生抵抗。随后在111例有MMR缺陷的结直肠癌患者中发现100例患者存在这种A重复序列的缺失，这些患者中TGF-βRII mRNA翻译出的多肽包含129或161个氨基酸残基（取决于有多少A缺失），而野生型TGF-βRII应该包含565个氨基酸残基。（From C Lengauer，K. W. Kinzler and B. Vogelstein，Nature 396：643-649，1998）

图 12.28 子宫内膜组织中MLH1活性的抑制 用抗hMLH1抗体进行免疫组织化学实验（抗体上连接有过氧化物酶，当其结合MLH1抗原时产生棕黑色点）。子宫内膜癌患者的正常子宫内膜组织既有强棕黑色细胞，说明hMLH1高表达，也有着色很弱的细胞，后者DNA特异性染料（DAPI）染的细胞核很明显，但没有MLH1的着色。子宫内膜肿瘤组织没有hMLH1染色，只表现出微弱的DAPI染色。分子生物学分析表明肿瘤细胞中*hMLH1*基因的启动子高度甲基化。在一些邻近肿瘤组织的正常组织中*hMLH1*表达缺失的事实说明，*hMLH1*表达缺失是肿瘤进展中相对早期的事件，其发生早于引起癌症的组织病理学变化。

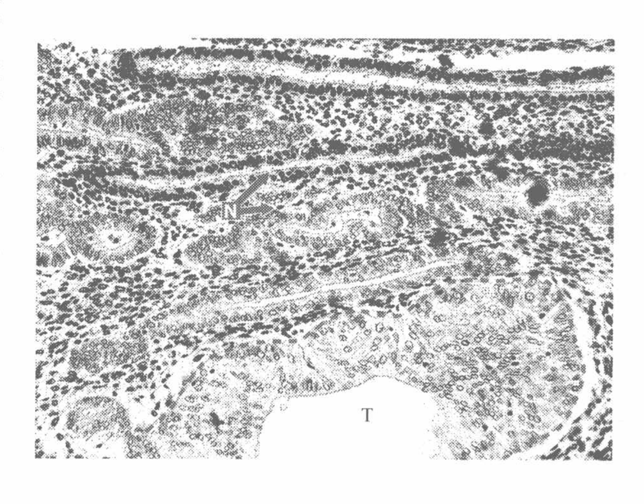


表 12.2 人类肿瘤细胞基因组中由于错配修复缺陷导致失活的基因和蛋白

基因	编码蛋白的功能	野生型编码序列	结肠	胃	内膜
ACTRII	GF 受体	A_8	×		
AIM2	诱导干扰素	A_{10}	×		
APAF1	前凋亡因子	A_8	×	×	
AXIN-2	Wnt 信号通路	A_6，G_7，C_6	×		
BAX	前凋亡因子	G_8	×	×	×
BCL-10	前凋亡因子	A_8	×	×	×
BLM	DNA 修复反应	A_9	×	×	×
caspase-5	前凋亡因子	A_{10}	×	×	×
CDX2	同源异形盒转录因子	G_7	×		
CHK1	DNA 修复反应	A_9	×		×
FAS	前凋亡因子	T_7	×		×
GRB-14	信号转导	A_8	×	×	
hG4-1	细胞周期	A_8	×		
IFRIIR	延迟 GF 受体	G_8	×	×	×
KIAA097	未知	T_9	×		
MLH3	MMR	A_9	×		×
MSH3	MMR	A_8	×	×	×
MSH6	MMR	C_8	×	×	×
NADH-UO8	电子传输	T_9	×		
OGT	糖酵解	T_{10}	×		
PTEN	前凋亡	A_6	×		×
RAD50	DNA 损伤反应	A_9	×	×	
RHAMM	细胞运动	A_9	×		
RIZ	前凋亡因子	A_8，A_9	×	×	×
SEC63	蛋白易位到内质网	A_{10}，A_9	×		
SLC23A1	转运子	C_9	×		
TCF-4	转录因子	A_{10}	×	×	×
TGF-βRII	TGF-β 受体	A_{10}	×	×	×
WISP-3	生长因子	A_9	×		

引自 A. Duval and R. Hamelin，Cancer Res. 67：2447-2454，2002.

缺乏 *MLH1* 和 *MLH2* 表达的细胞除了丧失错配修复功能之外，还表现出对在正常情况下激活 G_2/M 检测点或诱导细胞凋亡的烷基化致突变剂的抗性。这种细胞在暴露于 DNA 损伤剂后仍然可以连续通过 G_2/M 期并逃避凋亡，而且可以产生抑制正常 MMR 功能、但不影响在 DNA 受损情况下诱导凋亡能力的 MSH2 突变体，说明在这种特定的 MMR 蛋白中，识别 DNA 损伤、修复损伤、发出警报信号、包括凋亡信号等功能分别由不同的结构域执行。

不断发现的甲基化错配修复基因提供了直接的证据：体细胞获得性（非遗传性）的 DNA 修复功能缺陷赋予了进化中的恶性肿瘤前体细胞在肿瘤进展中的复制优势。在许多表现出微卫星不稳定性的肿瘤细胞基因组中，成百上千的基因都发生突变。表 12.2 只列出了其中的一小部分。

表 12.2 中的数据存在偏倚，因为只是随意选择了一些基因进行检测，而且只对这些基因内部同源多态性微卫星相关序列进行了测序。但这个表格还是很有趣的。如其所

示，编码一种重要促凋亡蛋白的 *BAX* 基因（9.9 节）可通过突变被沉默，这种突变是由其正常可读框中 8 个 G 重复序列的延伸和 MMR 缺陷引起的。在其他的促凋亡基因中也发现由一个同源多态序列的碱基数目改变造成的突变。甚至编码 MMR 蛋白的基因本身也会因为 *MMR* 的缺陷而失活。

进一步的研究将揭示表 12.2 中所列的一些基因的失活是如何造成肿瘤细胞的复制优势的。即使解决了这一问题，还有一个主要的问题没有回答：为什么 *MMR* 缺陷及其引起的微卫星不稳定性优先与结肠癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜瘤相关，而与其他部位的肿瘤很少有相关性？

12.10 各种其他 DNA 修复缺陷通过未知机制增加了肿瘤易感性

到目前为止，与肿瘤相关的最著名的基因是 *BRCA1* 和 *BRCA2*。这两个基因中的任何一个发生胚系等位基因突变都会导致先天性的乳腺癌和卵巢癌易感性。例如，几乎一半已确认的家族性乳腺癌有 *BRCA1* 或 *BRCA2* 等位基因的胚系突变。据统计，家族性卵巢癌中有 70%～80%是由 *BRCA1* 或 *BRCA2* 等位基因的胚系突变引起的。在这两个基因第一次被发现时，据其参与细胞增殖、生长和分化的动态调节（参见第 7 章），人们认为应该将之归于抑癌基因。但是越来越多的证据表明这两个基因实际上参与维持基因组的完整性，应该归入“caretakers”（DNA 修复蛋白）的行列，而非“gatekeepers”（肿瘤抑制蛋白）。

可以用一些相关的证据证明上述基因参与基因组完整性的维持。研究发现 BRCA1 和 BRCA2 蛋白在核内形成大的复合物并与核内大量的其他蛋白相互作用。这个大的复合体含有 Rad50/Mre11 和 RAD51 蛋白——与酵母中两个在电离辐射（如 X 射线）引起的 DNA 断裂修复中起重要作用的蛋白同源。同时，在该复合体中也发现了错配修复蛋白。

有趣的是，用能导致 S 期复制叉停滞的羟基脲处理细胞，可使 BRCA1 分子改变其在细胞核中的定位。许多这些停滞的复制叉被认为是双链 DNA 的断裂位点，这种断裂是复制叉处尚未复制的单链意外断裂引起的（图 12.10），产生的断裂通常通过同源直接修复系统（HDR）修复。免疫荧光分析的结果显示，BRCA1 分子正常情况下以大量小点状的形式分布于整个细胞核，羟基脲使 BRCA1 分子聚集为少数的几个大的离散点，其中含有定位于复制叉的细胞增殖核抗原（PCNA，图 12.29）。还发现这些点含有其他一些已知的 DNA 修复蛋白，包括 Rad50 和 Rad51。BRCA2 蛋白也在这些点中，这又提供了一个其参与 DNA 修复过程的证据。而且，当用窄激光束有目的地使细胞核中不同区域出现双链 DNA 断裂时，发现 BRCA1 蛋白与 γ-H2AX 共定位于该区域。γ-H2AX 是一个磷酸化的组蛋白，出现在双链 DNA 损伤的染色质侧翼位点（补充材料 14 ◎）。参与 DNA 修复的共 12 个不同的蛋白也被募集到这一损伤区域。

在遗传学水平上敲除所有 BRCA1 功能的小鼠死于胚胎发育早期，但是仅丢失部分功能的 *BRCA2* 胚系等位基因突变造成恶性淋巴瘤的易感性增加和染色体异常，这些异常染色体结构显示两个染色体臂之间的非同源重组（或融合）率的增高（图 12.30）。该染色体结构是 DNA 双链断裂异常修复的特征性结果，其中许多可能偶然出现在细胞周期 S 期的复制叉处（图 12.10）。此外，缺乏完整 BRCA2 功能的母细胞的两个姐妹染

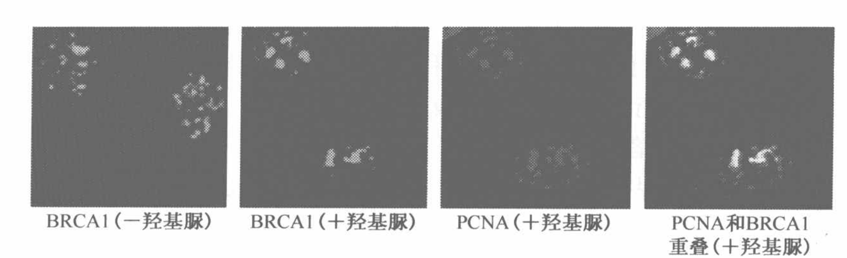


图 12.29 BRCA1 对 DNA 损伤的反应 BRCA1 蛋白（用荧光标记的抗体）通常分布于 S 期细胞核内大量离散小点的位置（绿色，第一幅图）。但是，当用羟基脲（HU）处理 S 期细胞的时候，复制叉停止，BRCA1 蛋白脱离这些小点，聚集为少数的几个大点（绿色，第二幅图）。可观察到增殖细胞核抗原（PCNA）也有相似的重新定位模式，已知该蛋白与复制叉相关（红色，第三幅图）。黄色点表示 BRCA1 与 PCNA 的共定位（第四幅图）。这些停滞的复制叉往往是复制叉处尚未复制的单链 DNA（因而很脆弱）偶然断裂造成的双链 DNA 断裂位点（图 12.10）。这些结果说明 BRCA1 被募集到了双链 DNA 断裂的位置。(From R. Scully, J. Chen, R. L. Ochs et al., Cell 90: 425-435, 1997.)

色单体在有丝分裂过程中不能随着胞质的分裂而彼此分离，此种姐妹染色体不分离现象如何精确影响核型还有待阐明。这种分离缺陷显示，BRCA2 除了具有协调 DNA 双链断裂修复的功能外，还有其他功能。然而，其他关于 *BRCA1* 和 *BRCA2* 突变细胞内 dsDNA修复缺陷的指征，来自于检测培养的细胞恢复中 X 射线引起的 DNA 双链断裂的能力的实验。缺乏大部分 BRCA1 功能的细胞对 X 射线杀伤的敏感性显著增加。

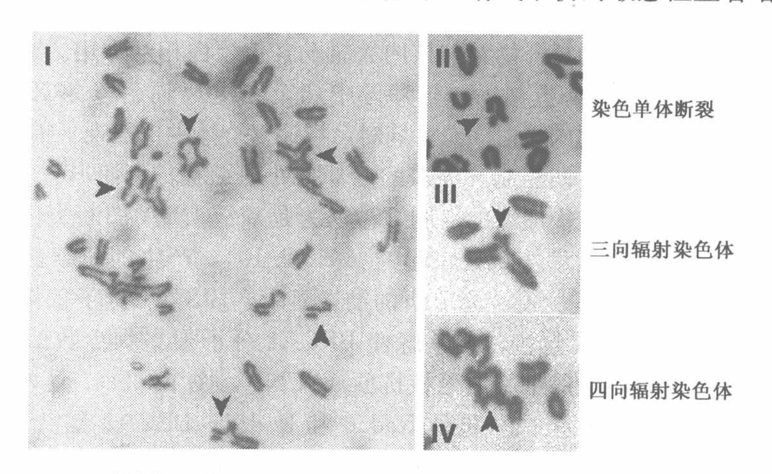


图 12.30 BRCA2 功能部分缺失引起的核型改变 来自小鼠胚胎的成纤维细胞中可以观察到各种类型核型异常，该小鼠的 *BRCA2* 基因是纯合型，编码截短的 BRCA2 蛋白。这些异常包括染色体臂之间融合导致的易位，通常表现为有丝分裂中期染色单体的非正常配对。染色体臂之间融合通常由双链 DNA 断裂未修复或异常修复引起。当融合生成的杂交染色单体与未受影响的姐妹染色单体配对时就形成了此图中的结构（图 I）。在这些异常染色体中，dsDNA断裂引起的中期染色体结构有染色单体断裂（图 II）、三向辐射染色体（图 III）和四向辐射染色体（图 IV），而在野生型细胞中很少见到类似的染色单体配对。(From K. J. Patel, V. P. Yu, H. Lee et al., Mol. Cell 1: 347-357, 1998.)

一条染色单体上 dsDNA 断裂的修复通常依赖于姐妹染色体上未损伤的同源序列，即通过参照仍然完整的 DNA 片段指导修复装置重建断裂的双螺旋结构（图 12.31）。因此，这种同源直接修复（HDR）主要发生在细胞周期 S 期的晚期和 G_2 期，这个时期姐妹染色体的 DNA 双螺旋能提供修复损伤染色单体的序列信息（在 S 期，DNA 复制产生两个完全相同的染色单体，并且它们维持为一个整体直到下次有丝分裂）。如果双螺旋出现链内的共价横向连接，HDR 也会发挥作用。

在 BRCA1 或 BRCA2 功能丧失的细胞中，所有类型的同源直接修复（HDR）都表现异常，RAD51 蛋白（直接与 BRCAI 相伴的、BRCA2 连接的蛋白）的行为可以部分解释这种现象。已知 RAD51 能结合单链 DNA 分子，使其侵入（并因此解开）同源双链螺旋，该过程是起始 HDR 必需的（图 12.31）（BRCA2 有 8 个 BRC 结构域，原则上每一个都可以与一个 RAD51 分子结合，表明 BRCA2 可将 RAD51 分子装配成线状，从而与 ssDNA 协同结合）。如果缺少 BRCA1 或 BRCA2，RAD51 可能就不会被募集到

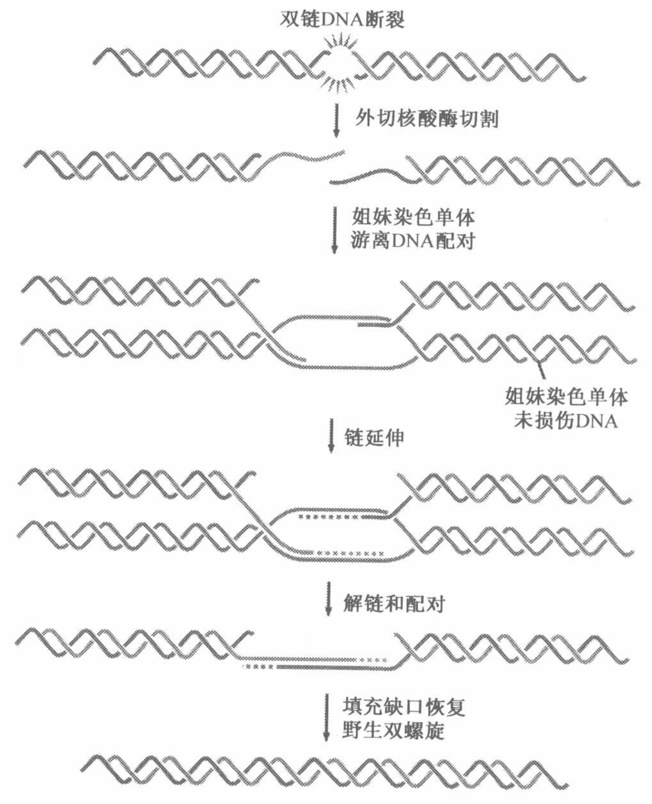


图 12.31　同源直接修复　细胞周期 S 期后期和 G_2 期 DNA 双链断裂的修复，通常依赖于修复装置参照最近的 S 期形成的未损伤姐妹染色体的能力。这种同源直接修复（HDR）开始于外切核酸酶在 dsDNA 断裂形成的每一个末端切除双链 DNA 中的一条链（顶部）。接着，产生的每个 ssDNA 链（蓝，红）侵入未损伤姐妹染色单体的双链形成的双螺旋内（绿，灰）。这个完好的染色单体已经被修复装置解螺旋，以便为侵入的 ssDNA 与该染色体上的互补序列配对提供空间。然后，来源于损伤染色单体的 ssDNA 以完好的姐妹染色单体链为模板，在 DNA 聚合酶的催化下以 $5'\rightarrow3'$ 方向延伸。延伸 ssDNA 链从该染色单体上释放并与另一个配对，在 DNA 聚合酶和连接酶的作用下进一步延伸，重建野生型 DNA 序列具有的双螺旋结构。已知的或被认为参与这一复杂过程的 DNA 修复蛋白包括 RAD51、BRCA1 和 BRCA2。

dsDNA的断裂位点，随后的 HDR 过程也不会正确进行。在 *BRCA2* 突变细胞（图 12.30）分裂中期见到的三向辐射和四向辐射染色体就是这些细胞内修复装置失去利用 HDR 修复双链 DNA 断裂能力的结果。

Nijmegen 断裂综合征患者也存在同源性修复缺陷（表 12.1）。他们的细胞，缺乏 Nbsl 蛋白质，无法起始 HDR。由于不能进行 HDR，这些患者的细胞转而通过非同源末端连接（NHEJ）将两个 dsDNA 的**末端融合**（NHEJ；图 12.32）。

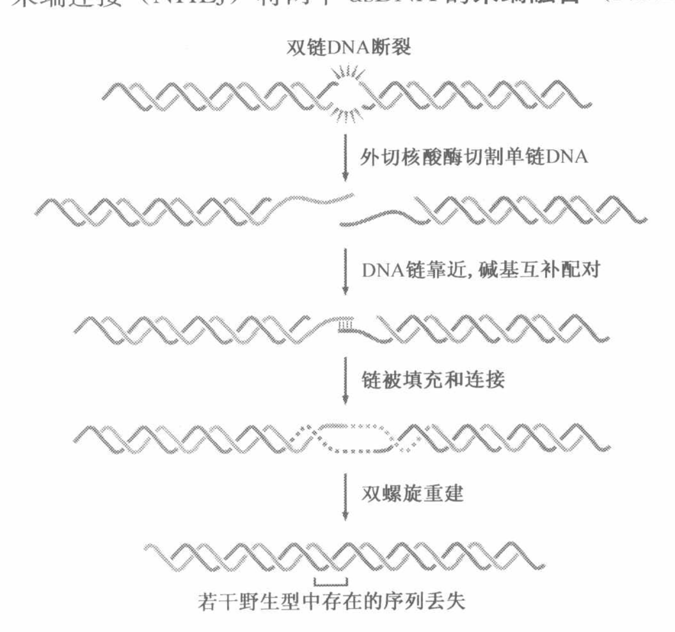


图 12.32 非同源重组末端连接 在姐妹染色单体上的核苷酸序列未能有效引导修复系统正确连接断裂的双链末端的情况下（图 12.31），NHEJ 就发挥作用修复 DNA 双螺旋。在 NEHJ 过程中，对来自两个双链端单链的切割形成 ssDNA，这些 ssDNA 可相互连接，可能是通过碱基间的有限配对实现的，这里列出了 4 对碱基。接着填补单链缺口，连接其他剩余的 ssDNA，重建 DNA 螺旋上最初出现的缺乏碱基的双螺旋结构。（Adapted from M. R. Lieber，Y. Ma，U. Pannicke and K Schwarz， DNA Repair 3：817-826，2004.）

NHEJ 必然是一个错误-倾向过程，因为在一个姐妹染色单体上的野生型 DNA 序列不会出现两个融合的 DNA 片段的排列，产生的末端-末端融合在连接位点形成突变序列，解释了 Nijmegen 断裂综合征患者恶性肿瘤发病率高的原因。一个或多个 NHEJ 成分缺陷、同时 P53 功能缺失者小淋巴瘤的发生率非常高。

有趣的是，NHEJ 多发生在 G_1 晚期，恰好是姐妹染色单体不能进行同源直接修复的时期。实际上 NHEJ 在 DNA 修复过程中的作用是独一无二的，因为其在与 DNA 损伤修复无关的正常生理条件下发挥功能（信息栏 12.9）。

信息栏 12.9 NHEJ 与免疫功能的发育 NHEJ 在正常的基因重排过程中是不可缺少的。这种基因重排可产生功能性抗体和 T 细胞受体。例如，编码抗原-结合位点的 DNA 序列的形成依赖于染色体 V、D、J 片段的重排和融合。如果 NHEJ 过程所需的全套蛋白组分不完整，上述的 DNA 片段融合就不会发生。这导致正常的免疫球蛋白（抗体）和 T 细胞受体生成障碍，这二者都是体液免疫和细胞免疫系统的组分（15.1 节有详细介绍），同时引起严重的联合免疫缺陷综合征(SCID)。同样在多数类型转换过程中也需要 NHEJ（补充材料 21），正常情况下，这一过程可产生能够编码免疫球蛋白抗原结合部位的融合 V、D、J 片段，通过与免疫球蛋白基因稳定区片段结合，从而产生各种各种抗体分子。

BRCA1 和 BRCA2 在维持 DNA 和染色体结构正常、避免癌症发生中到底如何发挥作用还不是很清楚。BRCA1 和 BRCA2 可以与多种参与 DNA 修复的核蛋白结合的事实说明，

它们至少可部分地作为分子支架募集其他蛋白复合物。一旦完成聚集，这些修复蛋白就会协同作用，修复 DNA 上的损伤和大片段的双链断裂。而且，如 12.33B 图所示，BRCA1 缺失可以破坏某些正常情况下对 DNA 损伤作出反应的细胞周期检测点的调控。

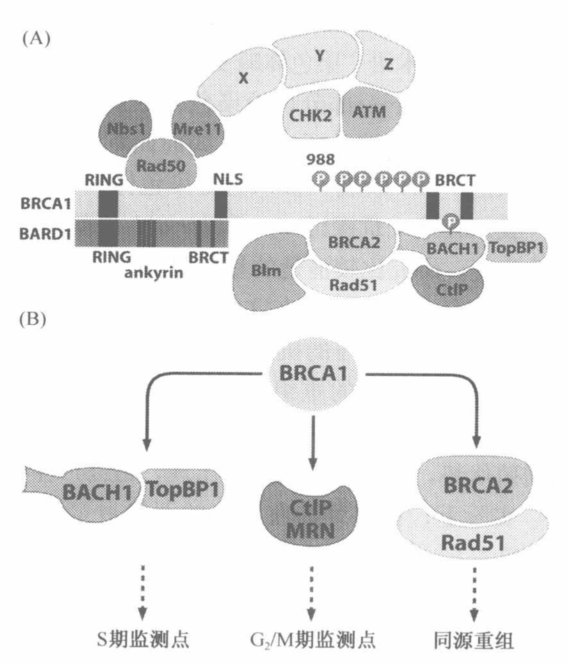


图 12.33 BRCA1、BRCA2 和相互作用分子 (A) BRCA1 和 BRCA2 蛋白至少部分作为支架蛋白募集一系列其他的 DNA 修复蛋白，形成一个大的复合物。这一多蛋白复合物一旦形成即辅助 DNA 双链断裂的修复，通常通过同源直接修复（HDR）完成。例如，*BRCA2* 基因的一个外显子编码 8 个 BRC 结构域的拷贝，可辅助募集 RAD51 分子，如图 12.31 所示。由 MRE11、Rad50 和 Nbs1 组成的 MRN 复合物似乎可识别双链 DNA 断裂的末端，从而激活 ATM 激酶的功能。(B) BRCA1 不同配体的缺失除了影响同源重组和同源直接修复外，还可特异性地影响细胞周期不同的检验点的调控，表明 BRCA1 在参与 DNA 修复功能的一系列不同的蛋白中作为支架蛋白发挥着关键的作用。(A and B, Courtesy of R. A. Greenberg and D. M. Livingston.)

我们不清楚为什么遗传性 *BRCA1* 和 *BRCA2* 等位基因突变容易引发乳腺癌和卵巢癌，也不清楚为什么 *BRCA2* 的体细胞突变有时会与前列腺癌和结肠癌有关。而且，*BRCA1* 和 *BRCA2* 等位基因胚系突变的**外显率**（每个等位基因对个体表型产生的可见的影响程度）也难以量化（补充材料 23 ◎）。

随着对 BRCA1 功能研究的逐步细化，其作用机制却越来越令人迷惑，原因是这个蛋白很大，生理条件下影响很多分子，继而衍生出不同的生物学功能。例如，BRCA1 与许多转录调节子有联系。而且很明确的是如果女性的细胞内 BRCA1 功能缺失，就不能正常地使体细胞中的一条 X 染色体失活（信息栏 1.2）。BRCA1 的这些生物学功能与它的 DNA 损伤修复功能及它的等位基因胚系突变特异诱发女性肿瘤的倾向是如何联起来的，尚不清楚。

12.11 癌细胞核型经常以染色体结构改变的方式发生改变

早在对 DNA 损伤及其修复认识之前，人们就已经知道癌细胞中存在核型的异常。实际上，近一个世纪以来，人类已经认识到癌细胞中普遍存在着异常染色体。在 BRCA1 和 BRCA2 功能缺失的细胞中可见到三倍体和四倍体的中期染色体就是很好的例子（图 12.30）。癌细胞中核型的异常有两种形式：单个染色体结构的改变和对染色体结构改变没有影响的数量变化。

常见的一种由正常的二倍体核型衍生来的染色体异常包括特定染色体数量的增加或减少。癌细胞偶尔通过有丝分裂过程中出现的各种异常，从而获得多倍体的基因组，多出来的染色体可能是**单倍体**（产生**三倍体**），也可能是**二倍体**（产生四倍体）。有时也可

能出现单条染色体的拷贝数增加，但丢失比较少见。

“非整倍体”（aneuploidy）通常是指正常（或**整倍体**）核型发生染色体数量变化后的情况。但是，近年来非整倍体这一术语所指的范围偶尔也会扩大到包括各个染色体结构的变化，这种异常见于大部分实体瘤细胞（>85%）。在此，对于染色体结构变化，我们将使用一个更专业的术语“染色体畸变”。这两种主要的核型异常是由完全不同的机制引起的。

我们将在下一部分讨论染色体数量的变化。现在讨论染色体结构变化的机制，本文中其他部分已经涉及了这点。如前面章节所述，偶然发生在 DNA 复制叉处的、不能修复的双链 DNA 断裂，被认为是染色体易位的主要机制。

我们在第 4 章探讨 *myc* 和 *bcr-abl* 癌基因的产生机制时已经了解了一些癌症相关的染色体改变。研究比较清楚的易位是 *myc* 原癌基因易位与三个免疫球蛋白之一的启动子序列发生融合（4.5 节）。在这些及其他的淋巴瘤中，很可能是负数免疫球蛋白和 T 细胞受体（TCR）基因重排的机制失灵，并不是让它们形成融合基因（见信息栏 12.9），而是催化错误的染色体间的重组，使免疫球蛋白基因杂乱的与整个基因组中分散的基因融合，*myc* 基因仅为其中之一。发生在原癌基因 *myc* 的稀有易位可使其转录失调，细胞获得特异的增殖优势，导致细胞克隆的出现，最终产生具有特异核型改变的淋巴瘤。

实际上，在多种造血系统的恶性肿瘤中报道了许多其他高度特异性的易位（如表 4.4 和 4.5）。引起蛋白结构发生各种改变的分子机制还不清楚。但是，第 10 章提到了一种很吸引人的假设，即端粒断裂引起的断裂-融合-桥（BFB）循环（图 10.14）。这些 BFB 循环使单个染色体产生大范围的结构异常，所有染色体都有一定的发生频率。有时，这些易位可能使细胞获得生长优势，猜测还可能是导致携带这些异常染色体的细胞克隆生长原因。

在各种造血系统肿瘤中发现一些相似的结构异常。这些易位许多是可重复发生的，因为在一系列独立发生的肿瘤中都发现了这些易位。到目前为止，已经对数百种可复发的易位进行了分类。因为这些易位位于染色体上高度特异的位点，所以其发生的分子机制可能不同于上述的断裂-融合-桥循环。

产生这些易位的分子机制还不清楚，因为发生这些易位的造血细胞中参与免疫球蛋白基因和 T 细胞受体基因重排的酶不表达。对易位断裂点侧翼 DNA 序列的分析发现了重复、缺失和倒位，提示一些“错误-倾向”的 DNA 修复机制，如前面提到的非同源末端连接（NHEJ）可能参与其中，但还需要进一步证明。

总之，对于染色体易位还有两点不清楚：DNA 修复机制中的哪些组分负责阻止这些异常结构的形成？这些染色体异常一旦形成是如何促进癌症发生的？

12.12　癌细胞核型还经常以由染色体数量改变的方式发生改变

如前所述，一些类型的遗传不稳定性通过改变单个染色体的数量，而不改变其结构影响核型，这些改变可产生非整倍体。尽管“突变”通常指 DNA 序列的改变（因此也包括染色体结构的改变），但我们应该认识到染色体数量的变化同样代表了一种基因组的显著改变，对细胞的行为会有深刻的影响，严格地说，这也是一种突变类型。

染色体数量的变化通常在受到染色体不稳定性（CIN）影响的癌细胞中出现。当

CIN 阳性的癌细胞从患者体内移除或在体外繁殖时，CIN 的结果就变得很明显，因为当在培养皿中增殖时，这些细胞持续地改变其染色体组成。从患者体内移除这些癌细胞时它们已经是非整倍体，在体外表现出的核型不稳定可能只是体内肿瘤发生过程中不稳定性的一种延伸（图 12.34）。

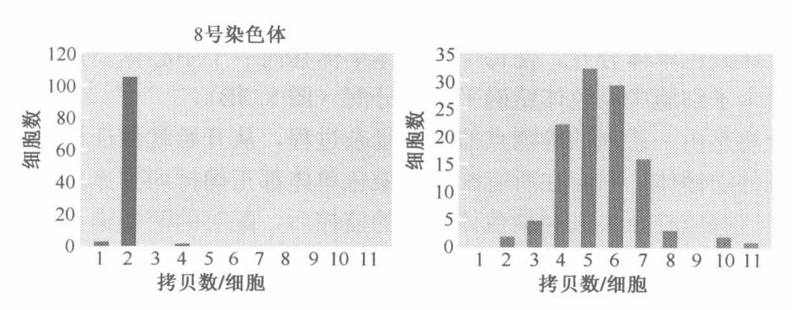


图 12.34　培养癌细胞中的染色体不稳定性　用荧光原位杂交（FISH）检测正常细胞（左）和培养的具有染色体不稳定性（CIN）的乳腺癌细胞（右）中 8 号染色体的拷贝数。如图所示，在正常细胞内 8 号染色体大部分为 2 个拷贝，在受 CIN 影响的细胞内 8 号染色体的数量变化很大（对随机选取的另一个染色体进行研究，同样发现了染色体拷贝数的相同分布）。这种明显的细胞-细胞之间染色体数量的变化表明，在培养的癌细胞增殖过程中这种染色体数量的变化持续频繁地发生。（From G. A. Pihan，A. Purohit，J. Wallace et al.，Cancer Res. 58：3974-3985，1998.）

癌细胞的非整倍体核型可以有两种解释：一种是癌细胞向高度恶性状态进展过程中混乱状态的一种结果；另一种观点认为非整倍体是肿瘤发生的重要原因，是肿瘤发生过程中的必然事件。因此，一些人认为大部分癌细胞在生长过程中需要这种染色体不稳定性来扰乱其基因组，从而获得更有利于肿瘤生长的染色体组型。根据第二种观点，如果缺乏与非整倍体相关的致突变性的增加，那么大部分初期的细胞克隆就不会获得多阶段肿瘤发生所需要的遗传学改变。

对结肠和直肠癌的一系列研究有助于解决上面的争论。少数表现出微卫星不稳定（MIN）的肿瘤出现相对较少的非整倍体，且没有染色体不稳定性（CIN）。相反，大量的 CIN 肿瘤细胞没有表现出 MIN 特征性的核苷酸序列改变。总之，这些观察表明至少在结直肠癌中，肿瘤细胞基因组的突变性必须增加，这些机制中的一种或其他几种可以提供这种突变性。这一结论提示 CIN 像 MIN 一样，通过促进肿瘤形成的方式重建细胞基因组。这种逻辑是否也与造血系统恶性肿瘤的遗传学机制一样还不清楚（信息栏 12.10）。

信息栏 12.10　并不是各种人类癌细胞中都出现广泛的染色体异常　一般癌细胞的染色体核型和造血系统肿瘤细胞的核型表现出显著的差异：上皮性肿瘤细胞几乎都存在广泛的核型异常，包括各种非交互易位，染色体臂的缺失以及其他的复制。相反，造血系统肿瘤细胞的核型除了一个或两个交互易位外通常是二倍体，这种易位可能是促使癌症发生的始动因素或向特定阶段进展的促进因素（如形成 BCR-ABL 癌基因的易位）。因此，并不是所有人类恶性肿瘤的形成都需有核型的异常。

在大部分造血系统肿瘤细胞中发现的少量核型改变，其本身很可能不足以引起完全的瘤性增生（在慢性髓性白血病中，BCR-ABL 癌基因形成后，在白血病急性发作、复发时通常伴有由点突变引起的 p53 功能的丧失；当然这种核型是不可见的）。而且，没有在造血系统肿瘤细胞中发现微卫星不稳定性的报道。因此还不清楚何种遗传机制可使造血系统细胞获得全部必要的突变的等位基因，使其像肿瘤细胞那样增殖。实际上，我们甚至不清楚造血系统肿瘤的形成是否需要和实体瘤一样多的遗传学改变（见 11.12 节）。

造成染色体不稳定性的染色体数量变化通常是有丝分裂过程中染色体错误分离的结果。在正常细胞周期的 M 期，染色体排列到赤道板与由微管蛋白组成的纺锤体纤维相连，一起形成中期纺锤体。中期纺锤体是一种双极结构，每一个半极由微管纤维组成，其中许多由位于染色体的**动粒**（与染色体着丝粒 DNA 相关的核蛋白体）延伸出来再回到中心体，后者负责组织整个中期纺锤体结构。当这一“装置”正常运转时，纺锤体纤维将成对的姐妹染色单体分开，使每个染色体单体移向一个中心体。这一过程保证细胞分裂产生的两个子细胞中染色体精确平等的分配（图 8.3B）。

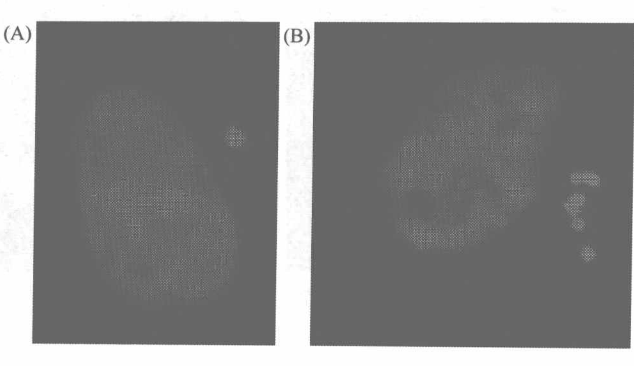
染色体分离是由一系列的检测点监控的复杂过程，从开始就保证精确形成两个中心体和两个半极的纺锤体，只有在所有配对的染色单体都正确排列到赤道板后染色单体才可以分离。当这些监控点失去对染色体分离的监控后，配对的两条染色单体可能被拉向同一个中心体（即染色体**不分离**）。因此，该条染色体在其中的一个子细胞中可能是单体，而在另一个子细胞中则形成三体。在有些情况下，某条染色单体可能没有与纺锤体纤维连接从而在子代细胞的基因组中丢失。

如果纺锤体本身没有正确的组装就会出现更广泛的核型混乱。早在 1890 年就发现了纺锤体组装错误引起的有丝分裂异常，这也是癌细胞中存在遗传学异常的第一个线索。在正常**间期细胞**的胞浆中可见单个中心体（图 12.35A）。有丝分裂过程中，两个中心体在细胞内两极相对排列。但是在癌细胞中经常可见这种组织形式存在显著缺陷，包括在间期出现多个中心体（图 12.35B 和 C）。结果可能是出现多极的，而不是正常细胞内见到的两极的有丝分裂纺锤体（图 12.36），同源染色体在三个或更多的子细胞中分配。更进一步，染色体错误地分配到子细胞中可能导致染色体数目和整个核型的变化。在一项对 87 种不同肿瘤的调查中发现，81 种存在中心体数量或微观结构的异常，而正常对照细胞中没有发现这些异常。

保证染色体正常分离的复杂装置一旦损伤就难以恢复。如图 12.34 所示，在一些乳腺癌细胞中 8 号染色体拷贝数的巨大差异表明，直到肿瘤进展完全，这些细胞中一直持续存在着染色体的不稳定性（CIN）。从这方面来说，CIN 与前面提到的断裂-融合-桥（BFB）循环（10.4 节）不同，这种循环对基因组的影响发生在肿瘤进展过程中有限的时间内，一旦细胞获得端粒末端转移酶使其核型稳定后就停止。

近几年已经阐明一些引起各种染色体不稳定的分子缺陷。毫无疑问，中心体的复制与细胞周期进展是紧密协调一致的，这一过程可能发生在 G_1/S 过渡期或接近 G_1/S 期。特别是越来越多的证据表明，中心体的复制与周期蛋白 E-和 A-周期蛋白激酶（CDK）复合物以某种方式协调一致（8.3 节）。有人类乳头状瘤病毒（HPV）E7 癌蛋白表达的原代细胞（只经过短期培养的细胞）中出现了中心体数目的**失调**，通常导致出现多个中心体。

E7 癌蛋白可结合细胞内的视网膜母细胞瘤蛋白（pRb 蛋白）使其功能失活，并加速其降解（8.5 节）。重要的是，一种失去了与 pRb 结合能力的突变形式的 HPV E7 癌蛋白不能诱导额外中心体的出现。总之，这些证据表明 pRb 功能缺失的一个结果是中心体复制的失调。既然中心体在有丝分裂纺锤体的组装中发挥关键的作用，那么这种失调就可能很快引起染色体数目的明显变化。实际上，在人类宫颈癌细胞中就发现了这种形式的染色体不稳定，几乎所有的这些细胞都表达 HPV 基因组的早期区域，该区域携



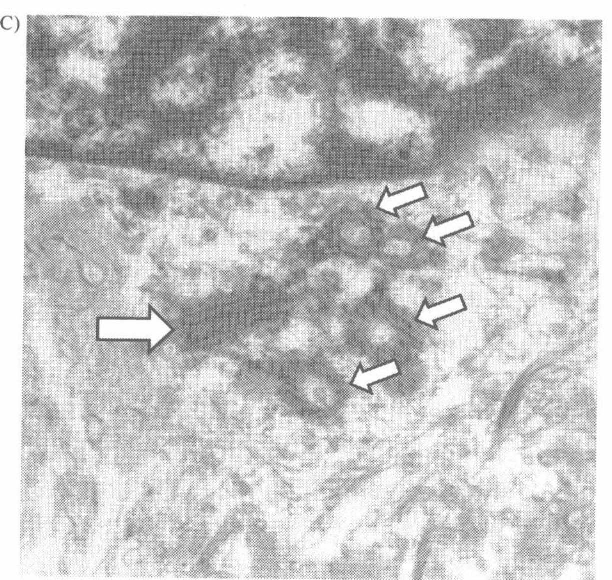


图 12.35 中心体及有丝分裂纺锤体的组织 中心体在有丝分裂中负责微管纺锤体纤维的组织。(A) 在永生化但非恶性的间期细胞中，用中心体相关蛋白 pericentrin 的抗体检测中心体可见胞浆中有单个中心体（红色）。该中心体通常在 G_1/S 期转化过程中复制，产生两个在有丝分裂纺锤体极可见的中心体。(B) 相反，在人类乳腺癌细胞的间期通常可观察到多个中心体，当其进入有丝分裂时产生多极纺锤体（图 12.36）。(C) 用透射电子显微镜（TEM）可观察到组成每个中心体核心的成对的中心粒。在横截面上可见 4 个中心粒（小箭头），第 5 个中心粒的侧面图也很明显（大箭头），表明中心粒的数目出现了失调，其上可见核膜。(A and B, from G. A. Pihan, A. Purohit, J. Wallace et al., Cancer Res. 58: 3974-3985, 1998; C, courtesy of M. J. Difilippantonio and T. Ried.)

带编码病毒 E6 和 E7 癌蛋白的基因。

HPV E6 蛋白（补充材料 12）与其他可使 p53 功能失活的因子一样可促进非整倍体的形成，因为关键抑癌基因功能缺失的细胞更容易出现非整倍体基因组。因此，HPV E7 癌蛋白使中心体数目不稳定，而 E6 癌蛋白通过对 p53 蛋白的作用使细胞能够耐受出现的任何中心体异常。在别的多种非病毒感染引起的肿瘤中，由其他机制引起的 p53 功能缺失的细胞中染色体数目异常的发生率同样增加。p53 功能、有丝分裂检测点的控制及染色体数量的监控三者之间的详细信号联系还不是很清楚。

pRb 调节的失活可导致控制 R 点转化的监控机制失效，从而使 HPV 感染初期的细胞立即获得增殖优势（8.2 节）。从长期来看这种增殖优势可传到子代细胞，因为中心体的数量将变得不稳定，进而使有丝分裂纺锤体排列混乱，造成核型的不稳定。随后发生的染色体数目变化使促进生长的基因与阻碍生长的基因以一定的比率发生相互作用，促进肿瘤进展。

有丝分裂的高度复杂性不禁使人们要问，这一过程是如何出现错误的，有多少调控蛋白（包括检测点控制蛋白）参与监控 M 期各个阶段的进展？酵母遗传学分析表明近 100 个不同的基因和蛋白参与有丝分裂各阶段纺锤体的装配和动力学、纺锤体的附着及

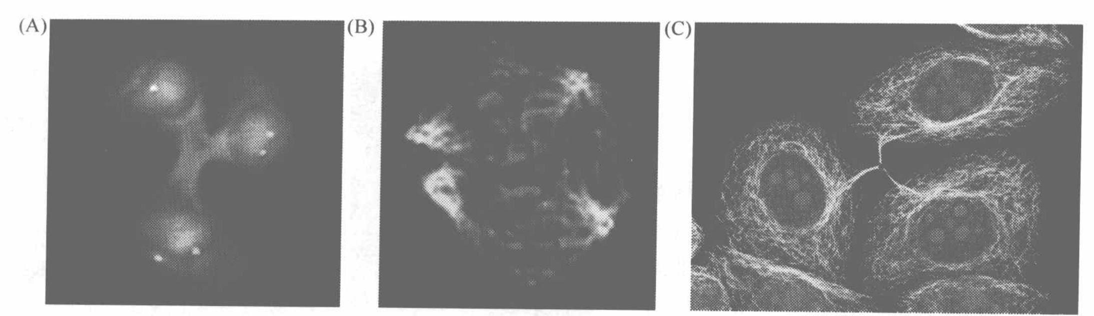


图 12.36　多极有丝分裂装置　在培养正常细胞的有丝分裂中期，由微管组成的有丝分裂纺锤体纤维从有丝分裂极的两个中心体伸出，到达染色体的动粒（与着丝粒染色体 DNA 连接的蛋白结构）。（A）$p53^{-/-}$ 的鼠胚胎成纤维细胞中形成的三个中心体导致有丝分裂纺锤体呈放射状排列，用 α 和 β 微管蛋白抗体将纺锤体纤维染成红色，染色体簇用 DAPI 染成蓝色。三个黄色的小点为中心体，用 γ 微管蛋白的抗体染色。这些现象表明 p53 可能调节中心体的数量。（B）多极纺锤体的出现明确表明，人口腔癌细胞中四个中心体处于激活状态。纺锤体纤维用微管蛋白抗体染为黄色。红色的动粒已经排列在赤道板上。染色体 DNA（用 DAPI 染为蓝色，不可见）与纺锤体纤维重叠的区域为绿色。（C）表示人宫颈癌细胞系细胞在末期后的胞质分裂期，由一个母细胞分裂为三个子细胞。微管（包括纺锤体纤维）染为黄色，DNA 为紫色。在胞质分裂末期这些细胞没有正常分离。（A，from P. Tarapore and K. Fukasawa，Oncogene 21：6234-6240，2002；B，from W. S. Saunders，M. Shuster，X. Huang et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97：303-308，2000；C，from K. G. Murti，BioTechniques，Oct. 2004 cover picture.）

染色体的分离。酵母中这些基因的突变可引起染色体不稳定性。其中的许多蛋白在进化中是高度保守的，哺乳动物中的同源蛋白也可能在有丝分裂中发挥作用。

到目前为止，只在少部分的人类肿瘤中发现在有丝分裂过程中参与染色单体装配和分离的酵母同源基因存在突变，表 12.3 中列出了其中的一些基因。关键的有丝分裂调节基因可能因为启动子区的甲基化而失去功能（7.8 节），但被文献证实的很少。实际上在大量参与有丝分裂的人类基因中，只有一小部分基因在肿瘤进展过程中的功能被研究。

表 12.3　癌细胞中影响染色体稳定性的突变、甲基化和过表达的基因

基因	基因产物的功能	癌细胞中改变的后果
BUB1	纺锤体装配检测	即使存在微管抑制剂有丝分裂也进展[a]
MAD1[b]	纺锤体装配检测	广泛的非整倍体
MAD2[b,c]	纺锤体装配检测	提前进入分裂后期[d]，非整倍体
Seurin	姐妹染色单体连接	染色体不分离[e]
ATM	染色体分离	中期—后期转化缺陷
Aurora-A，B，C	后期染色体分离	提前进入后期[d]
CHFR	纺锤体装配检测	染色体不分离、丢失[e]
14-3-3σ	DNA 损伤检测	未修复染色体分离

a　微管抑制剂，如秋水仙素和噻氨酯哒唑，阻断有丝分裂纺锤体的装配。

b　Mad1 和 Mad2 在动粒形成复合物防止染色单体的分离，直到纺锤体纤维正确地形成。

c　在许多实体瘤中 *MDM2* 基因的转录被抑制，在胃癌中该基因经常突变。Mad2 位点为杂合子（$Mad2^{+/-}$）的小鼠成年后发生肺癌。

d　提前进入分裂后期可导致整条染色体的丢失。

e　染色体不分离是姐妹染色单体在分裂末期分离失败的结果。

有丝分裂调控基因的一个例子是 *CHFR*，该基因编码的检测点蛋白通常可阻止纺锤体微管和中心体排列异常时细胞周期由前期进入中期。这种检测点蛋白通常在人类细胞中广泛表达，但研究发现在 8 个随机抽取的人类肿瘤细胞系和 37 例肺癌组织标本中，分别有 3 个细胞系和 7 例标本该基因的表达由于启动子区的甲基化而被完全抑制。

另一个对 M 期进展起关键调节作用的是 14-3-3σ 蛋白。当基因组 DNA 受到损伤时 p53 诱导 14-3-3σ 的合成，随后该蛋白在胞浆中捕捉周期蛋白 B-Cdc2 复合物（9.9 节），通过隔离这些周期蛋白-CDK 复合物，14-3-3σ 成功地阻止细胞进入 M 期从而终止有丝分裂，直到损伤的染色体 DNA 得到修复。研究发现编码 14-3-3σ 蛋白的基因在一般的癌症（包括肺癌、乳腺癌、胃癌和肝癌）中通常被甲基化。由此导致的 14-3-3σ 的缺失必定在这些癌细胞非整倍体的形成过程中发挥着作用。

这两个例子（即 CHFR 和 14-3-3σ）只是冰山的一角。很显然还有许多其他的在稳定 DNA 序列和核型方面发挥关键作用的“看守者”基因有待被发现，从而确定肿瘤进展是缓慢发生的还是跳跃式的（补充材料 24 ◎）。

12.13 总结与展望

3.5 亿年前第一个细胞出现后，基因组不稳定性就成为生命中固有的现象。生命进程中生物体一直在基因组或多或少的不稳定中维持平衡。如果其过度地抑制突变累积率，那么达尔文的进化论（该理论直接依赖于产生遗传的多样性）就早已终止。相反如果任由突变率过多增加，那么其增殖能力、甚至其生命力都将受到严重威胁。在人体细胞（特别是胚系细胞）中相对较低的基因组不稳定性就是这两种冲突之间的一种妥协。

体细胞内不需要极力维持上述平衡。这些细胞中任何遗传的不稳定性，即我们所说的突变性都是不受欢迎的，因为基因组不稳定性为肿瘤的发生开启了一扇门。这也就解释了为什么在进化过程要极力保证我们体细胞基因组的稳定性。

多层的防御机制保障体细胞突变率维持在极低的水平。在生物学水平体现在干细胞及其分化的子代细胞的组织中。在生化水平上，一系列的酶和各种低分子质量的生化分子在致突变因素损伤基因组之前对其进行对抗和中和。如果发生损伤，或者是由于致突变剂突破了外层的防御屏障，或者是由于 DNA 复制发生错误，而且大量的 DNA 修复酶——“看守者”没有发挥作用，就预示着双螺旋结构和核苷酸将发生异常。通常情况下这些酶可有效地应付发生的损伤，使 DNA 恢复到最初的状态并消除任何损伤标记。除此之外，还有一系列蛋白确保只有当染色体正确排列在赤道板上后才能进行有丝分裂，以确保整倍体核型。

我们对 DNA 及其引人注目的稳定性的认识随着对这些“看守者”及其在维持基因组稳定性方面的多重功能的理解而改变。以前我们认为 DNA 是细胞内一种“岩石”般坚固的、一成不变的实体物质，如稳定的“岛屿”般位于无数的不断合成和降解的其他分子中间。现在我们认识到这种想法是非常简单的，是一种错觉。与细胞内的其他分子一样，DNA 在多种类型的损伤下都是十分脆弱的。DNA 显而易见的稳定性实际上反映了一种动态平衡，是一场正在进行的维持有序和制造混乱之间的战斗。染色体 DNA 表现出的任何稳定性都是随时保持警戒、准备修复即使是 DNA 双螺旋上微小损伤的一系

列“看守者”发挥作用的最好证明。

这些对癌症的意义是显而易见的：如果基因组完整性的破坏是人类肿瘤形成的必备条件，那么肿瘤细胞中担任警戒的修复机制及其调控者的削弱就是有力的证据。

第 9 章第一次提到基因组不稳定性时同时述及了被称作基因组“看守者”的 p53，因为 p53 功能缺失的细胞出现各种遗传缺陷的概率增加。这种增加的突变，包括 DNA 序列和核型的改变，大多数没有反应 p53 在维持基因组稳定性方面的直接作用。相反，p53 功能的缺失创造了一种允许突变细胞生存的环境。本章中我们将重点转向另一个问题：如果 p53 缺失允许突变（和高突变）细胞生存，那么这些细胞是如何在原发部位发生突变的?

肿瘤进展过程中经常发生突变，而且突变性增加是肿瘤病因学中的一个必要事件的观点越来越被人们所接受。正如本章开篇所述，1974 年人们就指出 DNA 高度稳定性的丧失对人类肿瘤的形成是必需的。这是在计算正常细胞中突变累积发生率和估计肿瘤进展所需的遗传学改变数量的基础上得出的结论。

没有这些增加的突变率，克隆演变的时间间隔就会太长。实际上最后一章和本章至少提供了两种可供选择的、在多阶段肿瘤进展过程中加速克隆演变的方法。肿瘤促进剂（包括内源性过程，如炎症）可缩短克隆演变的时间。或者如本章所述，基因组不稳定性也可加速这种演变。因为这两种过程通常同时发挥作用，所以建立肿瘤进展的数学模型非常困难。

现在我们认识到 1974 年的数学分析依赖许多定量假设，因此其主要的预测只是启示性的推测。在生物学领域，通常是实验结果比理论更具说服力。随后 30 年中各种实验观察为这一推测提供了强有力的、确凿的证据支持。现在我们知道人类肿瘤中普遍存在一种或几种遗传不稳定性。累积的证据表明，基因组不稳定性是人体内几乎所有肿瘤发生的必备因素。实际上，遗传不稳定性在人类肿瘤中是如此普遍，甚至可以将其列入肿瘤标志（可以用来界定所有类型的恶性肿瘤的一系列细胞特征）的行列。

人们预言遗传不稳定性在肿瘤进展中发挥关键作用多年后，一个生物学发现对这一观点提供了进一步的支持。在前一章我们提到乳腺肿瘤中的干细胞样群体（像正常组织中的干细胞一样）的功能是分化出复制潜能有限的瘤性细胞进而形成肿瘤块（11.6 节）。其他的工作对此有进一步的扩展（包括人类脑部和胃肠道肿瘤），看起来这些干细胞和过渡-扩增细胞组成的多级细胞体系会在大多数人类肿瘤中出现。

在大多数肿瘤中，这些干细胞样的细胞在全部肿瘤细胞中只占一小部分，但是这些细胞却可将肿瘤细胞的基因组传到子代细胞中。所以促进乳腺、脑部或其他部位肿瘤进展的突变必须发生在这些稀有细胞的基因组上。相反，由于肿瘤块中非干细胞的复制潜能有限，所以其基因组的突变（特别是瞬时扩增的细胞）对肿瘤的进展没有多大意义。但有一种突变例外，即可使过渡-扩增细胞获得无限自我更新能力的突变。

如果大部分促进肿瘤进展的突变只限于干细胞，那么肿瘤进展过程中的有效突变率（每个细胞分裂的突变积累）就远远高于以前的想象。早期的计算假设肿瘤组织中所有恶变前的细胞都同样合格，一旦突变就会成为新的、更加进化的恶性细胞的祖先（图 11.12）。

除了正常的消除突变的功能外，p53 在维持基因组稳定性方面也有直接的作用：

p53 阴性细胞的核苷酸切除修复（NER）存在缺陷。鉴于几乎一半的肿瘤中存在 p53 功能的失活，而另一半中有 p53 通路的失调，所以大部分的人类肿瘤中至少缺失一种 NER。重要的是，这种修复能力的部分丢失似乎只是代表了 p53 阴性细胞在恶性转化过程中许多基因组缺陷的一种。而且，有证据表明 p53 的两个近亲（p63 和 p73）通常与 p53 协同作用形成多亚基转录因子复合物，也可诱导编码 DNA 修复蛋白基因的表达。

BER 和 NER 缺陷造成的基因组亚显微结构的变化（不足以影响癌细胞的核型），与大部分实体瘤细胞中发现的广泛的染色体结构性紊乱一起，共同影响癌细胞核型。在 10.4 节中提到端粒的变短可启动断裂-融合-桥循环，可能引起基因组不稳定。同时我们知道这些染色体混乱可促进肿瘤进展。

比较基因组杂交（CGH，图 11.20）技术用于检测不同染色体 DNA 片段和染色体臂的拷贝数变化，因此可以定量分析基因组紊乱。如图 11.21 所示，一例人乳腺癌基因组中表现出单条染色体片段拷贝数很大的变化。肿瘤与肿瘤间的 CGH 图谱差异很大。但是这些拷贝数异常并不是完全随机的：对大量的独立乳腺癌研究结果进行综合分析就会发现，某些特定的染色体片段拷贝数变化经常发生（图 12.37）。既然这些变化在多种无关的肿瘤中出现，它们可能有利于癌细胞的增殖，但为何如此还不是很清楚。

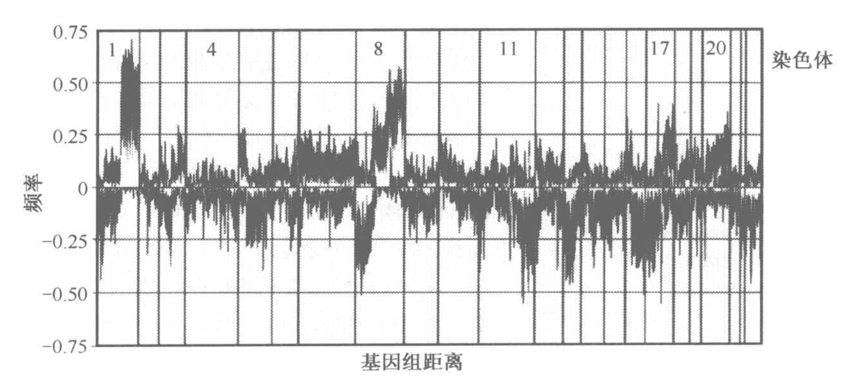


图 12.37　乳腺癌比较基因组杂交分析　人乳腺癌细胞的众多染色体片段和相关基因的拷贝数存在明显的变化。比较基因组杂交技术（CGH）可以比较正常细胞和肿瘤细胞内染色体片段的相对拷贝数变化（图 11.19）。每一个乳腺癌基因组的 CGH 分析都有不同的片段增加和丢失谱。但是大量乳腺癌 CGH 结果的综合分析显示，特定染色体片段的增加或丢失在许多肿瘤中出现，因此是可重复的、高频的。以存在不同程度扩增和丢失的肿瘤比例为纵坐标，从 1 号染色体开始的沿基因组的距离为横坐标，以存在高拷贝数异常的乳腺癌作为阳性值，低拷贝数异常的比例为阴性值绘图。垂直线代表染色体的分界线，黑色数值表示某个染色体区域的拷贝数显著高于平均值的肿瘤比例，白色数值代表拷贝数比均值高 50%和低 50%的肿瘤比例，红色代表拷贝数大于均值 4 倍（高扩增）和小于 35%（肿瘤基因组中多于一个拷贝丢失）的比例。这里的“均值”是对乳腺癌细胞基因组整体倍性研究基础上的一个基因的期望拷贝数。在这些癌细胞中发现重复出现的 1 号和 8 号染色体片段的扩增，而 8、11、13、16 和 17 号染色体片段经常丢失。(Courtesy of K. Chen and J. W. Gray)

癌细胞基因组获得的突变性是一把双刃剑，因为其也可使癌细胞处于危险中：由于致死性的、非修复性的基因组损伤缺陷造成的 DNA 复制染色体分离错误，使这些细胞

非常容易死亡。实际上每一代细胞中都可能发生癌细胞损伤，因为经常发生的基因组突变与持续的细胞生存是不相容的。而且癌细胞因为其DNA修复装置的缺陷可能暴露于二次危险中：它们可能对某些化学治疗很敏感（信息栏12.11）。

信息栏12.11　某些化疗药物对于DNA修复系统缺陷的癌细胞有选择毒性　现在的许多抗癌治疗利用了某些类型的癌细胞在修复和维持基因组稳定性方面的缺陷。聚［ADP-核糖］聚合酶（PARP1）通过与断裂的DNA结合吸引其他修复蛋白促进DNA修复。$Parp^{-/-}$小鼠可存活和生育表明存在多种DNA修复系统，这就解释了为什么PARP的抑制剂对于正常组织只有很小的影响。

BRCA1和BRCA2功能缺失的细胞依然可以生存是PARP及其合作分子作为支持系统、通过HDR在最低水平维持基因组稳定性的结果。这种类型的修复可能对S期复制叉处断裂的基因组的重建非常重要（图12.10）。因此BRCA1和BRCA2功能缺失的细胞对于PARP1抑制剂非常敏感（图12.38）。因为这些抑制剂对正常细胞的影响很小，所以将来PARP1抑制剂的化学衍生物可能作为高选择性的细胞毒制剂治疗BRCA1和BRCA2功能缺失的乳腺癌。

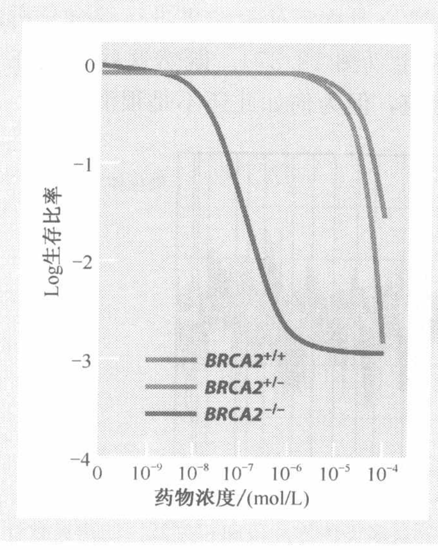


图12.38　抗PARP药物对BRCA2阴性细胞的杀伤作用　BRCA1和BRCA2阴性的乳腺癌细胞对PARP介导的HDR途径的依赖可能使tlqese细胞对抗PARP药物的杀伤更加敏感。用一种PARP抵制剂KU0058948处理三种基因型的鼠胚胎干细胞（ES），只有用很高浓度（横坐标）的KU0058948才可以杀死$BRCA2^{+/+}$（蓝色）和（$BRCA2^{+/-}$）（绿色）的鼠ES细胞，而杀死$BRCA2^{-/-}$阴性鼠ES细胞的药物浓度则低至1000倍（红色）。(From H. Farmer, N. McCabe, C. J. Lord et al, Nature 434:917-921, 2005)

用特异的克隆基因可诱导二倍体癌细胞的事实说明，如果一个细胞内发生的遗传具有适当的组合，包括癌基因和抑癌基因的突变，那么癌细胞中出现的无数染色体变化对于肿瘤的增殖就不是必需的。这就意味着在癌细胞成千上万的基因组改变中，只有一小部分与肿瘤的发生有因果关系。所以我们认为：一小部分关键调控基因的突变是引起瘤性细胞表型的原因之一；而基因组紊乱（如比较基因组杂交的结果所示）则是另一个原因。对大多数人类肿瘤细胞而言，在肿瘤多步骤发生过程中这两者通常同时出现。

我们对于肿瘤多步骤发生过程中第一性突变性的增加是何时出现的还不清楚。基因组不稳定性在一些癌症中可能出现在早期，而另一些癌症中可能出现在晚期。例如，通常可在结肠癌进展的早期检测到许多小腺瘤中已经存在的染色体不稳定性。可以想象，在获得了染色体不稳定性之后，结肠癌随后的进展过程会加速。

这种获得的遗传不稳定性在逻辑上很令人困惑。肿瘤进展过程中几乎所有的遗传学改变都会赋予肿瘤细胞立即生长和生存的优势。前面的许多章节提到了这些改变导致的

生长优势。这些结果会使我们认为肿瘤的进展过程与达尔文的进化论相类似（11.5节）。但是，与癌细胞具有的许多特性不同，当细胞获得基因组不稳定的特性后，这种特性不会使细胞获得立即的增殖或生存优势。相反，这些特性的获得是一种长期的“投资”，也就是说其优势只能在后代细胞中体现出来。

我们可以通过以下内容来理解这种长期的优势。已经获得一些致癌性遗传学改变的细胞克隆在整个身体组织中出现的概率似乎很大。其中的大多数在人的一生中处于休眠的、癌前的状态，是没有威胁的，因为这些细胞内稳定的基因组可防止其获得进一步的、危险的突变。但是在极少的情况下，这些细胞中的一个细胞可能发生“看守者”基因的变化，这个细胞及其子代就第一次有机会通过检测新的遗传事件和序列的组合“修补”其基因组，其中的一些事件可能使其在肿瘤进展的道路上走很远。

可以肯定，其他的一些诱变剂（包括肿瘤促进剂和外源性突变剂）可进一步加快肿瘤向前进展的速率。在大多数人类肿瘤进展过程中，获得的基因组不稳定性扮演着开启遗传改变闸门的重要角色。总之，获得基因组不稳定的细胞克隆的命运是注定的，经过长时间后会兴盛；而那些没有这种不稳定性的克隆则可能许多年都没有变化。

正如我们本章前述，多种家族性癌综合征是由参与 DNA 损伤修复的重要基因的遗传突变造成的。基因组不稳定性或不稳定的倾向早已植根于这些遗传学上有问题的个体中。在这些情况下，遗传不稳定性就不再像大多数其他肿瘤中那样是一种获得的属性。

在一些情况下，如着色性干皮病的许多亚型，关键 DNA 修复基因的两个拷贝都存在遗传缺陷。这种纯合缺失状态使皮肤的所有细胞失去对紫外线诱导的嘧啶二聚体的修复能力。在其他情况下，如遗传性非息肉结肠癌（HNPCC），个体遗传了一个缺陷的错配修复基因的拷贝，剩余的那个拷贝在各种体细胞中通过杂合性丢失（LOH）而缺失。

目前已经发现的家族性癌综合征（包括 DNA 修复遗传缺陷）反应了强有力的胚系等位基因的作用。这些等位基因很可能会使其携带者在有生之年的某些时间点出现明显的疾病。但是已知的这些家族性癌综合征可能只是冰山的一角。因此，各种参与基因组稳定的突变等位基因在人类基因组中可能广泛存在。每一个等位基因可能只是轻微的增加一些癌症发生的危险，当研究一个家族患各种癌的风险时其作用并不明显。因此，大部分的常见肿瘤，如乳腺癌（见补充材料 24 ◎），可能与一些未知的胚系等位基因的遗传相关。

我们对于“看守者”基因缺陷相关的家族性癌综合征的认识有一点困惑：即使有很多理由让我们相信这些“看守者”基因是被各种组织广泛需要的，但这些疾病中的大多数只累及体内有限的组织。例如，为什么遗传性错配缺陷如此钟爱肠道肿瘤？乳腺癌的情况更令人费解。经计算，至少 7 个基因的遗传缺陷直接或间接参与人类乳腺肿瘤基因组稳定性的维持。包括 *BRCA1* 和 *BRCA2*、编码 BRCA1 相关蛋白（*BARD1* 和 *BACH1*）、*CHK2*（见补充材料 24 ◎）、*p53* 和 *ATM*（其功能是促使 DNA 损伤后 p53 激活，见 9.6 节）。

当然，在其他的例子中也存在这类困惑，如视网膜母细胞瘤基因 Rb 的遗传性等位基因突变的问题。该基因编码的蛋白 pRb 在体内几乎所有类型细胞内发挥功能，在细胞周期的调节中发挥关键作用。但是 Rb 等位基因遗传缺陷的儿童很容易在年龄很小时

患一种少见的眼部肿瘤，而到了青年时则发生骨肿瘤（见 7.3～7.5 节）。

到目前为止，利用细菌和酵母遗传学研究了在维持哺乳动物基因组稳定性中发挥作用的基因，发现了许多维持基因组稳定性所必需的基因。进一步延伸的话，这些基因在维持人类基因组稳定性方面可能也发挥着重要作用。如对酵母遗传和错配修复基因及 HNPCC 综合征的综合分析，很快发现了 6 个维持人类基因组稳定性的基因和蛋白质（见信息栏 12.8）。

通过这两种微生物遗传学发现的基因可能只占人类基因组中维持基因组完整性的一小部分。而人类“看守者”基因和蛋白到底有多少？酵母基因组的测序使我们对这一数字开始有了一些认识。最近的研究显示，酵母基因组大约由 5600 个不同的基因组成。其中 153 个被划分为与 DNA 复制和修复相关，88 个只与修复相关。本章中提到的许多基因都为多细胞生物所特有，表明参与这一过程的人类基因队列可能很庞大。实际上到 2001 年为止，已经在人类基因组中鉴别出多于 130 个 DNA 修复基因，到 2004 年达到了 150 个。陆续发现了一些在维持基因组稳定性和抑制癌症发生中发挥关键作用的基因和蛋白质，其中的一些发现很出人意料（见信息栏 12.12）。

信息栏 12.12　组蛋白在降低癌症风险中的作用　几十年来，人们认为组蛋白及其形成的核小体仅是染色质中的一种静态结构，功能是折叠和压缩染色体 DNA。20 世纪 90 年代早期开始明白组蛋白的共价修饰有利于调节染色质区域的转录活性。最近发现组蛋白在 DNA 修复过程中功能活跃。H2AX 是 H2A 组蛋白的变异体，在所有核小体中都存在。细胞中 H2AX 占 H2A 样蛋白的 15%，核小体中 H2A 的替代物广泛分布于染色质中（补充材料图 6 ◎）。当双链 DNA 断裂在染色体 DNA 中持续存在时，H2AX 分子（而不是其他组蛋白）羧基末端的丝氨酸残基就会被磷酸化，主要由 ATM 和 ATR 激酶（这两种激酶也负责 p53 的磷酸化及其激活，图 9.13）完成。磷酸化的 H2AX 在大部分染色体断裂点的侧翼区域（包含约 2Mb 的 DNA）都可见到。磷酸化的 H2AX 组蛋白能够招募 DNA 修复蛋白（如 BRCA1 和 NBS1）及至少四种其他辅助蛋白（图 12.29）。

H2AX 基因缺失的小鼠（因为该基因的胚系失活）可生存，但是发育迟缓。其细胞不能进行同源指导修复（12.10 节），容易积累染色体结构的异常。缺乏 H2AX 和 p53 蛋白的小鼠很容易产生造血系统肿瘤和实体瘤。即使 p53 缺乏的小鼠只丢失一个 *H2AX* 拷贝，淋巴瘤的发生率也显著增加。

这些结果表明，DNA 修复过程高度复杂，任何单个成分（许多还没有发现）的缺陷都会为癌症的发生开启大门。人类 *H2AX* 基因定位于染色体 11q23 上，该区域经常发生杂合性丢失或缺失，这就使那些发生恶变的细胞有可能丢失该基因及其编码的组蛋白。

研究新的、高度有效的癌症化疗药物的肿瘤学家有一天将阐明基因组保护装置的缺陷。如信息栏 12.5 所述，我们发现某些解毒酶（如谷胱苷肽-*S*-转移酶）可能在某些化疗药物作用其靶点之前将其解毒，从而影响肿瘤对药物的敏感性。

DNA 修复酶也可能影响化学治疗的疗效。以 DNA 烷基转移酶（MGMT，12.8 节）为例，如前所述在结直肠癌和神经胶质瘤中该酶的启动子区经常通过甲基化而失活，进而使基因组突变性增加。因为烷基化事件在细胞的生命周期中经常发生，是 *S*-腺苷甲硫氨酸（SAM）这类分子活动的副产品。许多化疗试剂也通过烷基化 DNA 鸟嘌

呤（准确地说是可被 MGMT 酶逆转的修饰）发挥作用。实际上，这种酶遗传缺陷的小鼠即使对很低水平的烷基化化疗制剂也高度敏感，甚至可能早衰或死亡。相反，过表达MGMT的小鼠对这些药物有抵抗作用。鉴此，将来致力于治疗像胶质瘤和结直肠癌这些肿瘤的肿瘤学家可以通过评价 MGMT 在癌细胞中的表达水平选择最有效的化疗药物。

肿瘤研究对其他一些看起来不相关的生物过程如衰老，也有极其深远的影响。至少已经发现 10 种不同的早衰综合征与一种或几种 DNA 修复系统成分的遗传缺陷相关。这种病的患者经常在青春期就表现出老年的特征。这些 DNA 修复缺陷引起的临床表现说明，未来有一天可能发现在许多正常的衰老过程中也存在的、细胞生命周期中积累的遗传学损伤。所以癌症与衰老可能有共同的“根”，随着我们的衰老，基因组也在逐步退化。未来的某一天人类可能发现一些有益的生活方式和好的治疗手段，使细胞内的基因组不再受到持续的攻击，从而在癌症和衰老的治疗方面有所突破。

重要概念

- DNA 结构的完整性和低突变性依赖于庞大的、复杂的生物学和生物化学机制，这些机制使体细胞突变以很低的频率在组织内累积。
- 其中的一些机制依赖于组织的结构，长寿的细胞（干细胞）受到保护，免于遗传损伤，而短寿命细胞（过渡-扩增与分化的细胞）易受这种损伤，但很快会被清除。
- DNA 复制错误产生的碱基错误掺入可加重突变累积的负担。DNA 聚合酶及其他许多错误校正蛋白（如参与错配修复的蛋白）错误率的降低可减少这些改变的数量。错配修复蛋白的遗传缺陷可导致患一些癌症的风险增加，特别是遗传性非息肉结肠癌。
- 细胞基因组持续受到各种化学分子的攻击，其中的许多分子是氧化磷酸化及其产物产生的活性氧分子的衍生物。细胞基因组也可能发生自发的化学改变，这种改变发生率很低，但影响很显著。
- 此外，细胞的基因组 DNA 也可受到外源性诱变分子的攻击。这些外源化合物及其活性衍生物可以来自污染物，但更大程度上是来自普通食物。
- 细胞常常试图在这些化合物攻击基因组 DNA 之前将其解毒，但解毒过程的副产物可能会比最初进入细胞的化合物活性更强，致突变性更高。
- 如果诱变分子的攻击成功地使 DNA 损伤，一系列精密的参与碱基切除修复和核苷酸切除修复的蛋白分子就会待命，以切除大部分损伤的碱基。碱基切除修复的遗传缺陷可使患癌症的风险、特别是患着色性干皮病的风险增加。
- 其他类型的 DNA 损伤包括双链 DNA 断裂，可由 X 射线或更常见的 DNA 复制叉断裂引起。
- 双链 DNA 断裂可在 G_1 期通过非同源末端连接或者在 S 和 G_2 期通过同源依赖性修复完成。双链 DNA 修复的遗传缺陷可解释遗传性 *BRCA1* 和 *BRCA2* 胚系等位基因突变的人群乳腺癌和卵巢癌的易感性。
- 影响细胞核型的机制可造成基因组的混乱。其中的一类包括影响染色体结构的改变，

如不相关染色体融合形成的易位。这种融合通常是由端粒缺损或不能修复的双链DNA断裂引起。

- 染色体数量的变化在癌细胞基因组中也很普遍，且可能有利于癌细胞中促进增殖和生存的基因比重增加。其中的许多变化来源于有丝分裂装置及其调控装置，特别是中心体的缺陷。
- 如果没有维持基因组完整性的各种机制的故障，那么基因组的突变率就会非常低，以至肿瘤进展所需要的遗传学改变就不会在细胞基因组中累积。

思考问题

1. 什么证据表明细胞基因组核型的改变对于肿瘤的转化并不是绝对必需的?
2. 在计算完成多步骤肿瘤进展所需的突变率时，必须知道什么参数才能准确描述实际的生物学过程?
3. 我们对肿瘤细胞中DNA修复过程缺陷的认识对研究新的抗癌治疗策略有何帮助?
4. p53功能缺陷及其引起的凋亡和DNA修复缺陷通过何种方式促进肿瘤的进展?
5. 如11章所述，什么样的肿瘤促进剂可促进恶性转化前细胞克隆的遗传演变?
6. 什么证据暗示了外源性致癌化学物质在人类癌症病理过程中的作用?与内源性诱变剂和诱变过程相比，如何估计这些外源性致癌物在癌症发生中的作用?
7. 各种细胞周期检验点的异常如何加速突变累积率?
8. 在降低组织突变基因的累积率方面，干细胞的生物学特性有何作用?
9. 在肿瘤多步骤进展过程中，肿瘤干细胞的存在如何影响突变累积?
10. 人类基因库中的遗传异质性如何影响防止体细胞等位基因突变累积的各种生物防御机制的功能?

参考读物

Ames BN (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* 214, 41–46.

Bartek J, Lukas C & Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 792–804.

Bartek J & Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429.

Burgers PMJ (1998) Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* 107, 218–227.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B & Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 9, M57–M60.

D'Assoro AB, Lingle WL & Salisbury JL (2002) Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, 6146–6153.

de Boer J & Hoeijmakers JHJ (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453–460.

Downs JA & Jackson SP (2003) Cancer: protective packaging for DNA. *Nature* 424, 732–734.

Duensing S & Münger K (2002) Human papillomavirus and centrosome duplication errors: modeling the origins of chromosomal stability. *Oncogene* 21, 6241–6248.

Fearon ER (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278, 1043–1050.

Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 22–33.

Friedberg EC, McDaniel LD & Schultz RA (2004) The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 5–10.

Friedberg EC, Walker GC & Siede W (1995) DNA Repair and Mutagenesis. Washington, DC: ASM Press.

Gold LS, Ames BN & Slone TH (2002) Misconceptions about the causes of cancer. In Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice (D Paustenbach ed), pp 1415–1460. New York: John Wiley & Sons.

Grady WM (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metast. Rev.* 23, 11–27.

Hartwell L (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71, 543–546.

Heinen C, Schmutte C & Fishel R (2002) DNA repair and tumorigenesis. *Cancer Biol. Ther.* 1, 477–485.

Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.

Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687–696.

Jallepalli PV & Lengauer C (2001) Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* 1, 109–117.

Jiricny J & Nyström-Lahti M (2000) Mismatch repair defects in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 157–161.

Kastan MB & Bartek J (2004) Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.

Kinzler K & Vogelstein B (eds) (1998) The Genetic Basis of Human Cancer. New York: McGraw-Hill.

Lengauer C, Kinzler KW & Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.

Lindahl T & Wood RD (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897–1905.

Loeb KR & Loeb LA (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379–385.

Loeb LA (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 61, 3230–3239.

Loeb LA, Loeb KR & Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 776–781.

Lynch HT & de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932.

Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 261–270.

Marnett LJ & Plastaras JP (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 17, 214–221.

Masuda A & Takahashi T (2002) Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene* 21, 6884–6897.

Modrich P & Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 101–133.

Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A et al. (2004) Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011, 101–111.

Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

Perucho M (2003) Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene* 22, 2223–2225.

Pierce GB, Shikes R & Fink LM (1978) Cancer: A Problem of Developmental Biology, Englewood Cliff, NJ: Prentice-Hall.

Pihan GA (1998) Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 58, 3974–3985.

Rahman N & Stratton MR (1998) The genetics of breast cancer susceptibility. *Ann. Rev. Genet.* 32, 95–121.

Rajagopalan H & Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Natur* 432, 338–341.

Scully R & Livingston DM (2000) In search of the tumour-suppresso functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408, 429–432.

Sedgwick B (2004) Repairing DNA-methylation damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 148–157.

Sieber O, Heinemann K & Tomlinson I (2005) Genomic stability anc tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* 15, 61–66.

Shiloh Y (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Ann. Rev. Genet.* 31, 635–662.

Shiloh Y (2004) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3, 155–168.

Smith ML & Seo YR (2002) p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17, 149–156.

Starita LM & Parvin JD (2003) The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 345–350.

Sugimura T (2000) Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 387–395.

Tainer JA & Friedberg EC (2000) Dancing with the elephants: the structural biology of DNA pathways. *Mutat. Res.* 460, 139–141.

Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171–182.

Wilson JH & Elledge SJ (2002) *BRCA2* enters the fray. *Science* 297, 1822–1823.

Wogan GN, Hecht SS, Felton JS et al. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 14, 473–486.

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J & Lindahl T (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284–1289.

Zhou BB & Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–438.

（王明荣　张　钰　王小春　史志周　郝佳洁）

第 13 章　对话代替独白：异质性相互作用和血管生成的生物学

简单的想法是错误的，复杂的无法实现。

Paul Valery，诗人，1942 年

本书此前的大部分章节都贯穿了一个简单而有力的概念：癌症是一种细胞疾病，肿瘤细胞的表型可以通过分析细胞内的基因和蛋白而得知。这个概念的来源很清楚，即来自细菌及酵母的遗传学研究。这两项研究均假定细胞的基因型决定细胞的所有表型。事实上，所有细菌和酵母的特性都是直接由这些微生物所含的基因所决定的。

将这个概念应用到多细胞动物及其组织，为生物学家带来了很多显而易见的便利。多细胞动物的器官复杂到难以计量，这种复杂性已经频繁地影响到科学家对其功能的研究。因此，许多研究者，包括分子生物学家、细胞生物学家和生化学家，都以这样一种**还原论**的方法去思考：当面对复杂的系统时，获得可靠、严谨结论的最好方法是将其分割成简单而易处理的组分逐一研究。虽然由此获知的信息只涉及复杂系统的一小部分，但这部分至少是确信可靠的，且后续研究者对复杂系统和其组分进行研究时不必对这一部分做本质上的修改。

这种还原论的思路使得许多肿瘤研究获得了成功。本书此前章节所描述的可以证明这样一个过程：当 20 世纪 70 年代发现第一个原癌基因时（3.9 节），人们对于肿瘤遗传学及分子生物学几乎一无所知。直到 20 世纪末科学界才了解到肿瘤是如何发生发展的。对癌症的这些认识很多都要归功于还原论方法：将正常组织与癌变组织分解为细胞，再将这些细胞细分解为分子。

如上所述，还原论受到了许多将肿瘤发展看作是细胞内部独立过程的癌症研究机构的拥护：肿瘤细胞的所有特性都可理解为是由这些细胞所含基因决定的。事实上，这些研究者还认为肿瘤所有特性都直接归结于组织中单个细胞获得的行为。

到 20 世纪末，越来越多的证据显示肿瘤的特性并不仅仅由其携带的单个细胞及其基因所决定。之前为广大肿瘤研究者所认可的简单化处理开始失效。渐渐的，人们认识到肿瘤实际上是一种组织疾病。确切地讲，我们将这种复杂的组织称为肿瘤。

还原论者否定了临床肿瘤医生和病理学家每天都面对的现实问题——实体瘤（80%的人类肿瘤由此构成），是由镜下可见的复杂结构的正常上皮转化形成的。对这些上皮来源的肿瘤进行组织病理分析显示，其是由很多不同种类的细胞组成的。甚至是显微镜下粗略的检查也能发现大多数实体瘤的组织学构成与其对应的正常上皮组织几乎一样复杂，图 13.1 可以说明这一点。在一些常见的实体瘤如乳腺癌、结肠癌、胃癌及胰腺癌中，那些组成肿瘤基质的正常细胞可以占到整个肿瘤组织的 90%以上。一个极端例子是另一种实体瘤——霍奇金淋巴瘤，在其肿瘤组织中非癌变细胞可以占 99%以上（图 13.2）。研究者的最初直觉是不理会这些非癌变细胞的，认为它们只能混淆对肿瘤生物

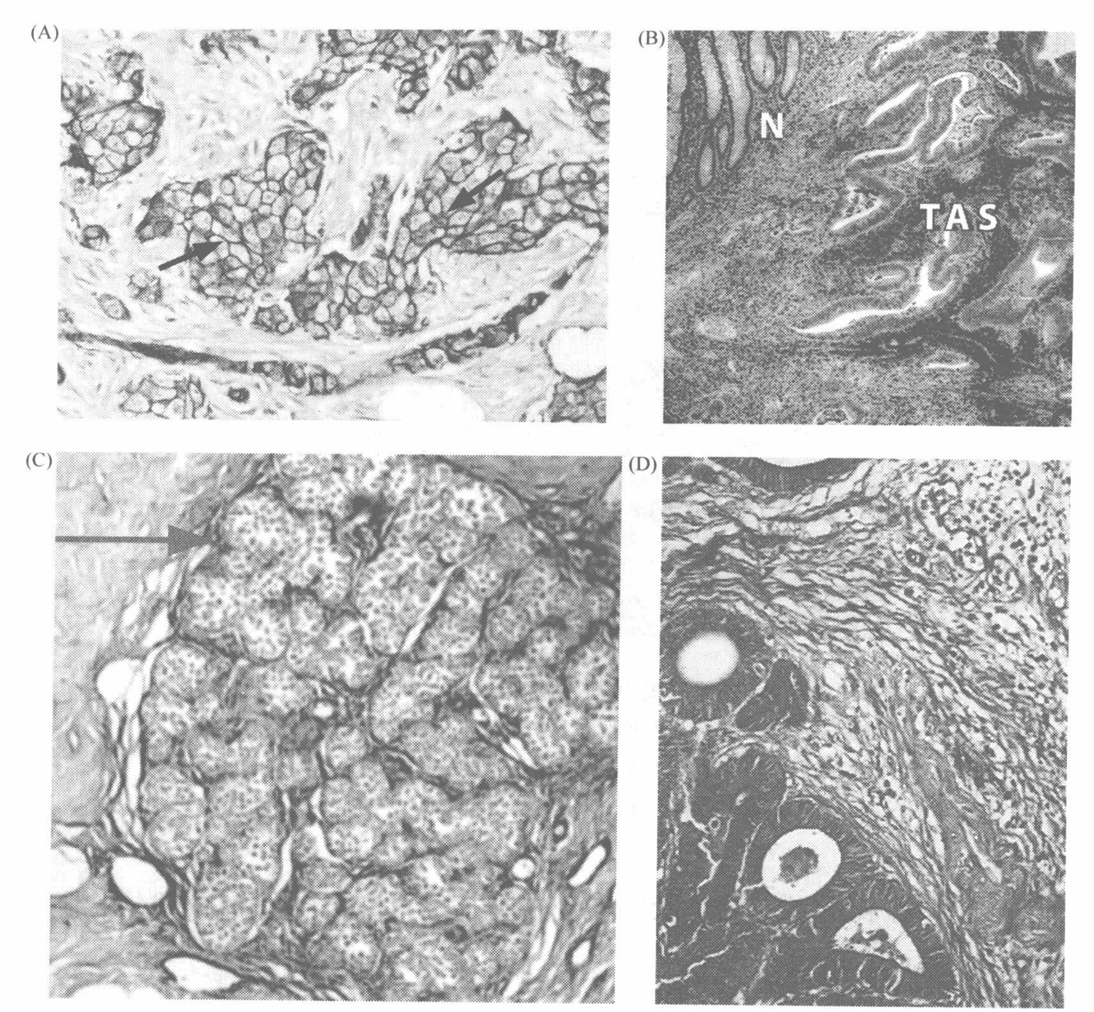


图 13.1　一些常见实体瘤的间质组分　各种常见肿瘤中都能明显区分出上皮来源的癌细胞和招募的间质细胞，这一点在图中很明显。(A) 高级别浸润型乳腺导管癌，上皮细胞膜被染成棕色（箭头所示），间质细胞核呈浅蓝色。(B) 直肠癌（右侧）和正常直肠黏膜（N，左侧），图中肿瘤相关间质细胞被 PINCH（一个与整联蛋白胞质区段相连的蛋白）免疫染色成深棕色，上皮来源的癌细胞核被染成亮蓝色。(C) 乳腺小叶原位癌，一小簇癌细胞（箭头示亮蓝色）被薄层间质纤维细胞（被 PINCH 免疫染色成深棕色）所包围。(D) 胃腺癌细胞（紫红色，左下）与延伸的间质（被胶原染成蓝色）相连。(A, from A. Gupta, C. G. Deshpande and S. Badve, Cancer 97: 2341-2347, 2003; B and C, from J. Wang-Rodriguez, A. D. Dreilinger, G. M. Alsharabi and A. Rearden, Cancer 95: 1387-1395, 2002; D, from S. Ohno, M. Tachibana, T. Fujii et al., Int. J. Cancer 97: 770-774, 2002.)

学的认识。近期研究则表明这些正常细胞、特别是间质细胞是非常活跃的，它们为肿瘤细胞所招募和利用，从而成为其必需的合作者。招募正常细胞的生物学意义非常重要，它们有助于肿瘤的生长。

这就意味着癌症绝不仅是肿瘤细胞内部相互作用的结果。恰恰相反，大多数肿瘤组织中恶变细胞与正常细胞不停地进行交流。本章我们将着重讨论实体瘤，因为这些肿瘤

组织内部恶变细胞与正常细胞的相互作用较其他类型肿瘤了解得更为清楚。

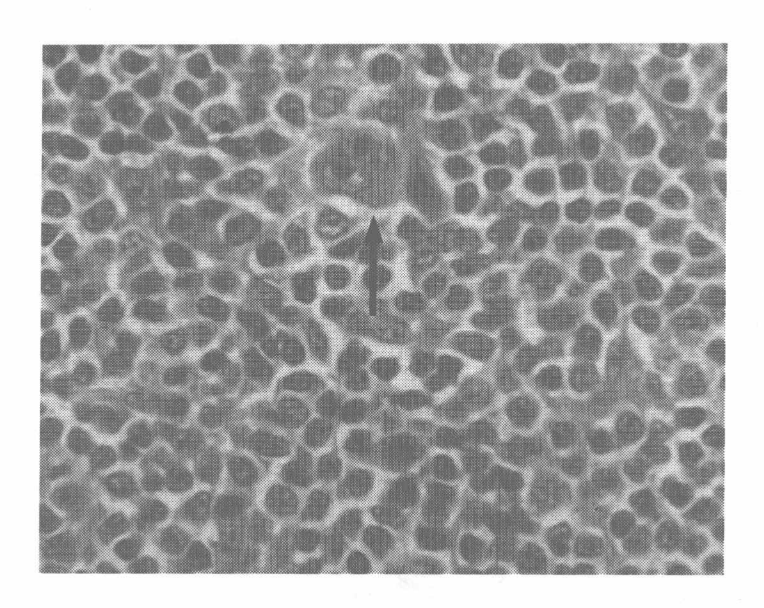


图 13.2 霍奇金淋巴瘤中罕见的恶变细胞 正常的、非恶变的细胞通常占肿瘤组织中活细胞的大多数，一个极端的例子是霍奇金淋巴瘤（一种焉常细胞比例高达 99%的肿瘤）。左图显示霍奇金淋巴瘤中正常细胞围绕着一个罕见的 Reed-Sternberg 细胞（箭头所指）

13.1 正常和恶性上皮组织均由相互依存的不同细胞类型所组成

上皮来源肿瘤组织复杂的间质成分只有在高倍显微镜下才清晰可辨。除了恶变的上皮细胞外，多种间质细胞也参与构成肿瘤组织。这些间质细胞包括成纤维细胞、成肌纤维细胞、内皮细胞、外膜细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、巨噬细胞、淋巴细胞以及肥大细胞（图 13.3；13.3 节）。由于其中某些种类的细胞仅占肿瘤间质的极小部分，只能利用免疫染色的方法检测其细胞特异性抗原显示其存在。

肿瘤中各种间质细胞属于能够在血液和免疫系统中产生结缔组织和多种免疫细胞的间质细胞谱系，因此与那些转化后可致癌变的上皮细胞在生物学上有很大区别。在非上皮来源的肿瘤如肉瘤中，肿瘤细胞本身就来源于间质组织，因此癌巢与正常组织之间的界线不容易辨别。

在没有其他信息的情况下，我们认为有两种可能使得各种间质细胞存在于实体瘤中。一种可能是其代表了在肿瘤形成前就存在于组织间质中的残留细胞。在后续的肿瘤细胞群体不断壮大的过程中，新生的肿瘤细胞可能迁入这些之前已存在的正常基底细胞层中，因此就形成了显微镜下显示的非常复杂的组织构成。

另一种对这个现象的解释更加有趣且对于绝大多数肿瘤来说可能是正确的。该模型的原理基于我们目前对正常组织是如何维持其结构和功能的认识。在这种组织中，适当比例的不同类型细胞必须依赖其间持续的信号交流。这种相互作用包括多种不同分化方

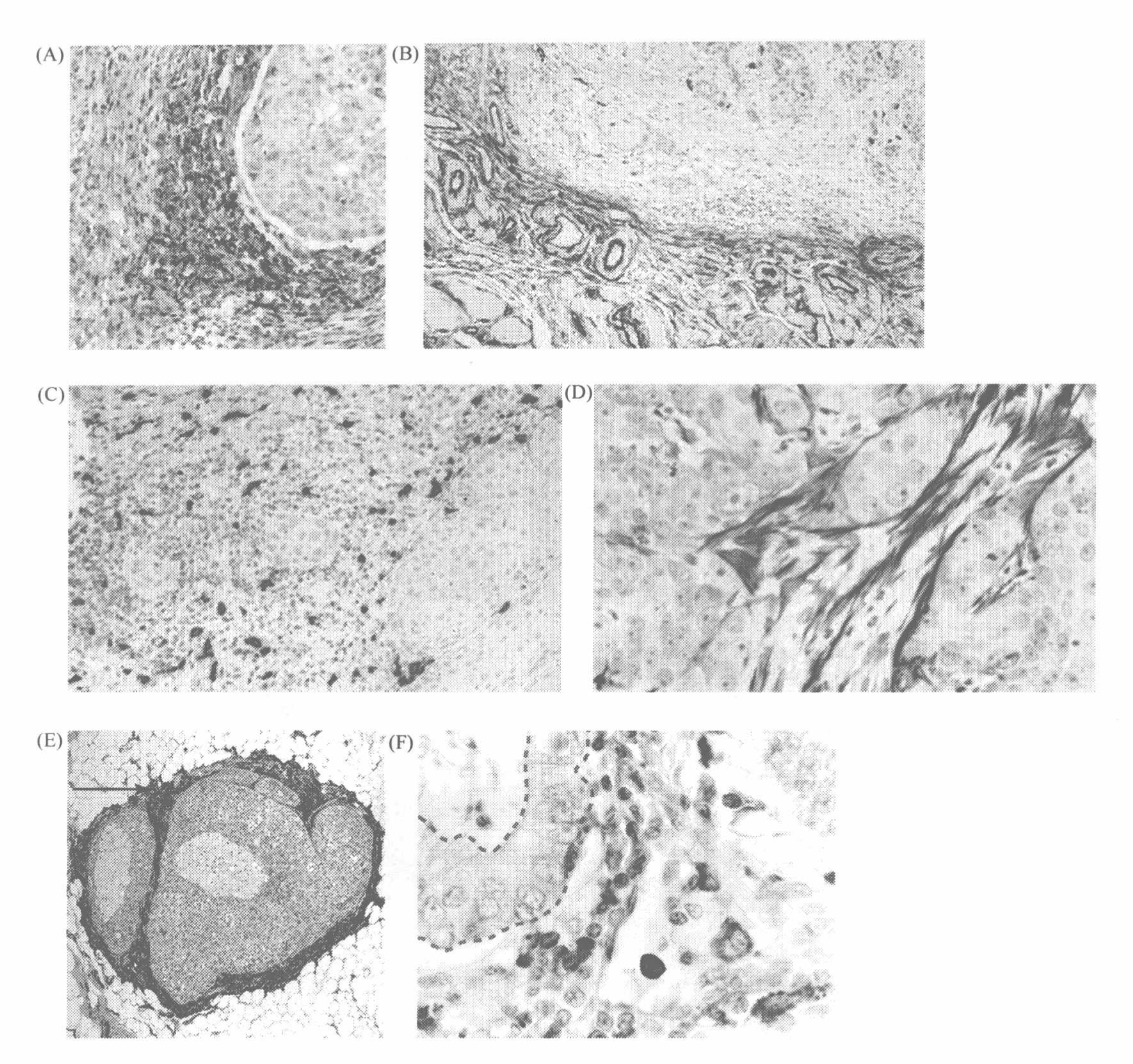


图 13.3　实体瘤间质中的多种不同细胞类型　多种抗体可用于特定类型间质细胞的染色。(A) CD4抗原阳性的 T 淋巴细胞（棕色）位于非小细胞肺癌的间质。口腔、咽及喉部的鳞状细胞癌的间质可能包含（B）CD34 阳性的纤维细胞（棕色），（C）CD117 阳性肥大细胞（棕色）和（D）α-平滑肌动蛋白阳性的成纤维细胞（棕色）。(E) 乳腺原位导管癌的间质显示 PINCH 阳性的成纤维细胞（深棕色，图 13.1B）环绕在癌巢周围（箭头所指），而同时又被脂肪细胞（浅蓝色）包围。(F) 在结直肠癌中，巨噬细胞的前身——单核细胞可被其所带的 CD11 抗原检测出。上皮来源的肿瘤细胞（浅蓝色）在左上方形成了一个导管。(A, from O. Wakabayashi, K. Yamazaki, S. Oizumi et al., Cancer Sci. 94:1003-1009, 2003; B, C, and D, from P. J. Barth, T. Schenck zu Schweinsberg, A. Ramaswamy and R. Moll, Virchows Arch. 444:231-234, 2004; E, from J. Wang-Rodriguez, A. D. Dreilinger, G. M. Alsharabi and A. Rearden, Cancer 95:1387-1395, 2002; F, from E. Barbera-Guillem, J. K. Nyhus, C. C. Wolford et al., Cancer Res. 62:7042-7049, 2002.)

向的细胞类型，它们之间的通讯被称之为**异质性**信号传导，不同细胞通过这种方式促进或限制其邻近细胞的生长。

由此推测，在正常组织中存在的多种异质性相互作用，在肿瘤形成中也发挥重要作

用。这可能意味着如同正常上皮细胞一样，肿瘤细胞可能通过从临近正常组织中招募间质细胞并促进其增殖，从而持续控制其附近间质细胞的数量。另一方面，间质细胞也可能影响肿瘤上皮细胞的增殖和存活。

在正常组织中，这些异质性信号通路主要依赖于下列因子间的交换：①生长因子，如肝细胞生长因子（HGF）、转化生长因子（TNF-α）、血小板衍生生长因子（PDGF）；②生长抑制信号，如转化生长因子β（TGF-β），以及③营养因子，如胰岛素样生长因子-1和-2（IGF-1和-2）（图13.4）。

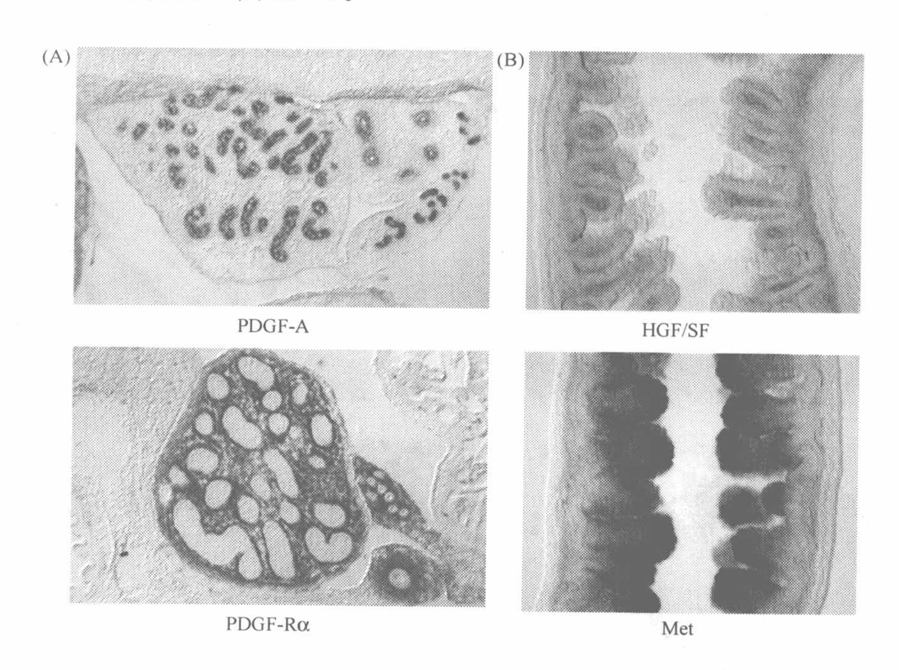


图13.4 异质性配体受体信号转导 （A）在上皮组织中，PDGF-A和其受体（PDGF-R）通常是由不同类型细胞合成的。在睾丸中如同在其他上皮组织中一样，PDGF的表达局限于管状上皮中（上），而其受体主要围绕间质细胞表达（下）。（B）被称作肝细胞生长因子（HGF）或分散因子（SF）的MET受体及其配体，如图显示位于胚胎小鼠回肠中（小肠的下段部分）。原位杂交显示在指状绒毛纵切面上间质细胞表达HGF/SF mRNA（上），而位于绒毛表面的上皮细胞表达Met（下）。（A，from L. Gnessi，S. Basciani，S. Mariani et al.，J. Cell Biol. 149：1019-1026，2000；B，courtesy of S. Britsch and C. Birchmeier.）

在肿瘤形成初期，异质性相互作用对促进多种类型肿瘤生长起着非常重要的作用。因为间质细胞，如巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等在参与炎性反应过程中释放TNF-α和前列腺素，这些分子进而促进了其附近上皮细胞的增殖（11.16节）。

在肿瘤形成以后异质性相互作用仍在起作用。例如，肿瘤上皮细胞时常释放PDGF，而间质细胞（特别是成纤维细胞、成肌纤维细胞和巨噬细胞）含有相应受体，同时间质细胞可释放IGF-1（胰岛素样生长因子-1），促进周围肿瘤细胞的生长和存活。类似地，黑色素瘤中的恶变细胞可释放PDGF，从而引发附近间质成纤维细胞分泌IGF-2，后者可提高黑色素瘤细胞的生存能力。乳腺癌中间质细胞分泌CXCL12（一种趋化因子，见13.5节）和HGF/SF生长因子，这些因子可刺激邻近上皮肿瘤细胞增殖

和存活。上皮细胞和间质细胞通过相互作用调节彼此的数量和位置，确保各亚型细胞在肿瘤和正常组织中保持最佳比例，并处于最佳位置。

正常上皮组织中基质细胞和上皮细胞互相协作，建立起存在于二者之间的特殊细胞外基质（ECM），也称为间底膜或基底层（图 13.5 和图 2.3）。例如，皮肤组织中的上皮细胞——角化细胞，会表达许多基底膜中特有的蛋白，包括 IV 型胶质原和层粘连蛋

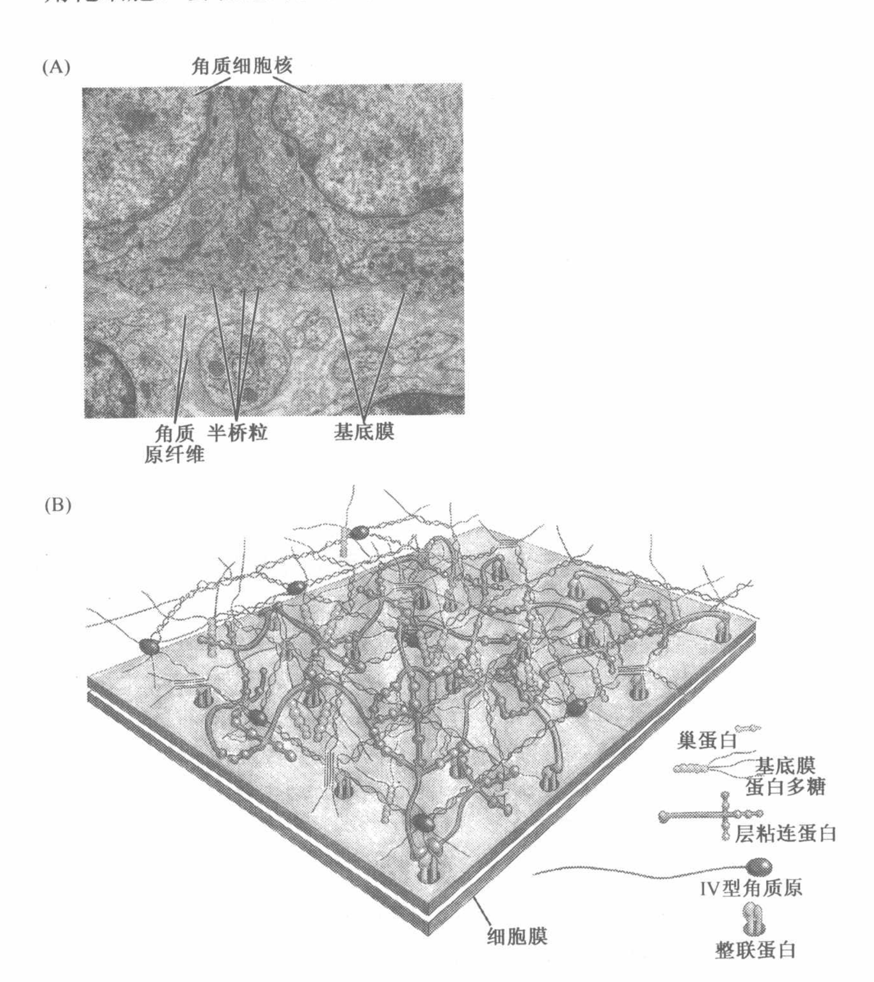


图 13.5　基底膜　（A）在上皮组织中，细胞外基质（ECM）被称做基底膜（BM），它将上皮细胞（上）和间质（下）隔开。该图是新生小鼠皮肤电镜照片，上皮细胞（称为角化细胞）聚集于 BM 的一端（上），由簇状整联蛋白结合 BM 蛋白，尤其是层粘连蛋白而构成的半桥粒将其锚定，角质细胞核在图中被标记。基底膜以下是构成皮肤的间质，如真皮的胶原纤维和部分间叶细胞。（B）该图显示了基底膜主要由四种 ECM 蛋白组成，分别为层粘连蛋白、IV 型胶原蛋白、基底膜蛋白多糖和巢蛋白。该高渗透性网状组织允许很多分子双向穿越。毛细血管中含内皮细胞的特殊基底层未出示。（A，courtesy of H. A. Pasolli and E. Fuchs；B，from B. Alberts et al.，Molecular Biology of the Cell，4th ed. New York：Garland Science，2002，based on H. Colognato and P. D. Yurchenko，Dev. Dynamics 218：213-234，2000.）

白。而间质细胞对基底膜的形成也有贡献，但其如何起作用还有待阐明。基底膜内特定的**蛋白聚糖**，如基底膜蛋白多糖，可增强其水合作用，并为其提供生长因子附着及长期贮存的位点。整联蛋白和半桥粒的作用使得细胞可黏附于基底膜上，这对多种上皮细胞的生存具有重要意义，而这种黏附作用的丢失常引发失巢凋亡，即由于失去锚定基质而引起的细胞凋亡形式（如图 9.21）。

组成毛细血管、淋巴管及其他血管壁的**内皮细胞**是正常和恶变间质中的重要成分（如图 13.6A）。这些内皮细胞的增殖由上皮和间质中的其他细胞促进，从而确保其获得充足的血液供应，这将会在以后章节中详细叙述。当毛细血管被组装并具有功能后，可为邻近细胞提供足够的养料和氧。之前我们介绍过，当细胞缺乏足够氧时就会释放可促进毛细血管生长的**血管生成因子**（见 7.12 节）。

当毛细血管生成时，内皮细胞分泌可促进其他非内皮细胞增殖的生长因子。最重要的，内皮细胞释放 PDGF 和 HB-EGF，其作用是吸引**周皮细胞**和血管平滑肌细胞，共同形成毛细血管外壁，这些**周皮细胞**也称作周细胞以区别于**腔内皮细胞**（信息栏 13.1）。当位于合适位置时周皮细胞（与平滑肌细胞非常相似）释放血管生成因子（VEGF）和促血管生成素-1（Ang-1），反过来为最初招募它们的内皮细胞生长提供了重要的生长信号。另外，这些周细胞为毛细血管在结构上提供稳定性，以抵御来自血流的压力（图 13.6）。

信息栏 13.1　生长因子的定位对于异质性相互作用十分重要　局部高浓度的 PDGF 对于保证招募至毛细血管外周的周细胞与内皮细胞的接触十分重要（图 13.6 C 和 D）。如同其他生长因子，PDGF-B（PDGF 分子的特殊形式）含有一段“滞留基序”确保其与胞外基质黏蛋白结合。因此，一旦 PDGF-B 分子由内皮细胞分泌到毛细管附近空间，这些分子即被邻近胞外基质捕获并高浓度的累积。当被蛋白酶切释放后，这些有活性的 PDGF-B 能确保周细胞招募至内皮细胞附近。然而，在表达“滞留基序”缺失的 PDGF-B 的小鼠中，该分子弥散远离内皮细胞，导致招募的周细胞无法紧贴内皮细胞。这些内皮细胞不仅缺少周细胞在结构上的支持，也无法得到周细胞分泌的 VEGF 分子，后者为内皮细胞长期生存所需。

癌巢中存在大量的间质细胞这一现象暗示随着肿瘤组织的扩大，这些细胞也同时增殖。事实上，在大多数**转移灶**（远离原发瘤位置上的继发性肿瘤组织）的边界也存在间质细胞。因此，就算是可独立游离原发瘤并在远隔组织生长的癌细胞也需招募基质细胞来助其增殖（图 13.7A），并形成新的癌巢。转移的细胞偶尔也会进入它们所侵入组织现存的间质中，再次证明了它们对获取间质支持的需要。

在最极端的情形下，所有维持正常组织功能的异质性相互作用都在肿瘤中继续发挥功能，即帮助恶变细胞增殖和存活，然而这个想法是不成立的，因为肿瘤细胞的许多特性（参见第 2 章）包括降低内皮细胞对分裂原的依赖性，从而使细胞获得抗凋亡和非锚定依赖性生长的能力，这会减少上皮和间质之间的作用。所以我们的结论是，获得这些特性后可以减少上皮细胞对间质的依赖性，但并不能消除这种依赖性。

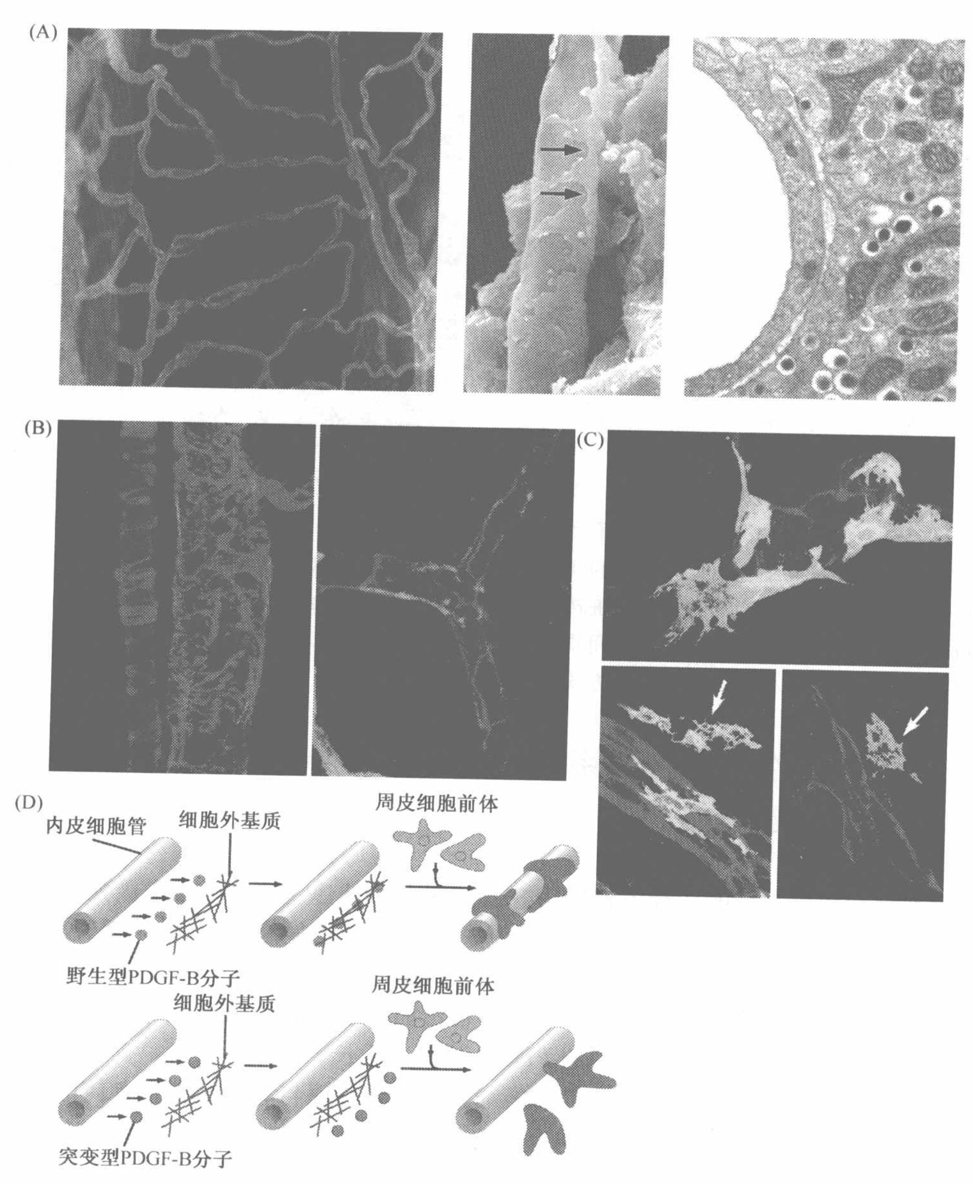


图 13.6 周细胞、平滑肌细胞、微血管中的内皮细胞 (A) 至少 3 种类型的显微镜可用来研究微血管。免疫荧光微观显示（左）正常小鼠毛细血管（使用识别内皮细胞特异抗原 CD31 的抗体）具有组织良好的网状血管。扫描电镜水平（中）可见毛细血管类似管壁平滑的圆柱状，其表面有周细胞黏附。透射显微图片（右）显示毛细血管壁由内皮细胞褶皱的细胞质组成。(B) 该免疫荧光显微照片包括周细胞及内皮细胞。周细胞和平滑肌细胞（橘红色）覆盖内皮管壁（绿色）外围，形成正常结构的小静脉和小动脉（左图）。在这些血管中，周细胞和平滑肌细胞将内皮细胞覆盖的十分严密以致很难观察到内皮细胞。与之相反，在毛细血管中（右图）周细胞排列疏松，但与内皮细胞紧密相连从而形成毛细管。(C) 周细胞（黄绿色）紧贴毛细血管（红色，下）。然而，在 PDGF-B 突变型小鼠中该分子无法黏附细胞外基质，周细胞因此无法接触内皮细胞并与毛细血管壁脱离（箭头，下）。(D) 周细胞与毛细血管壁的黏附依赖于 PDGF-B 的定位，该分子由内皮细胞分泌（浅绿色）。PDGF-B（深绿色）分泌后立即被胞外基质捕获（棕色），其功能是吸引周细胞前体（粉色）与内皮细胞形成的毛细血管壁紧密相连。若 PDGF-B 与 ECM（紫色）联系的肽段缺失，其自身会在毛细管腔弥散分布（下），周细胞也因此无法接触管壁。(A, from T. Inai, M. Mancuso, H. Hashizume et al., Am. J. Pathol. 165: 35-52, 2004; B, from S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh et al., Am. J. Pathol. 160: 985-1000, 2002; C, from A. Abramsson, P. Lindblom, and C. Betsholtz, J. Clin. Invest. 112: 1142-1151, 2003.)

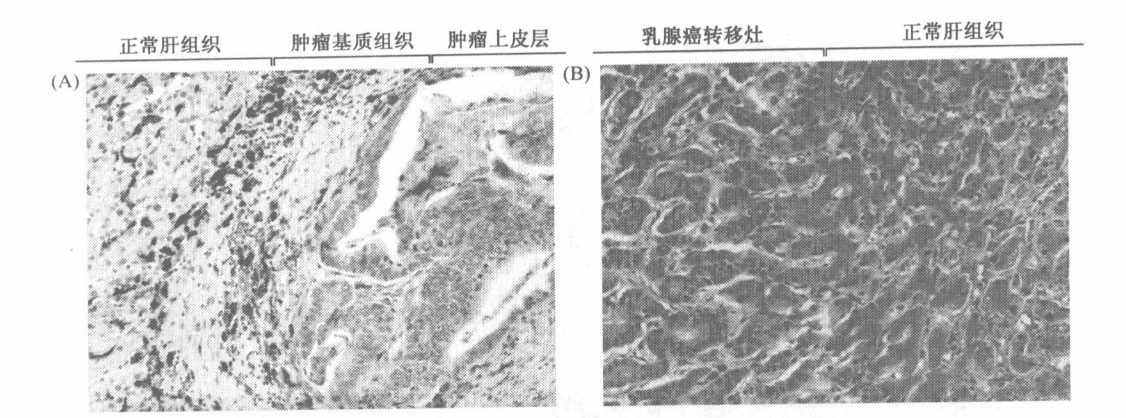


图 13.7 转移及其间质依赖性 （A）原发性结肠癌转移瘤显微图片揭示其在组织结构上与原发瘤同样复杂，如图 13.1。图中可见转移灶的癌细胞（淡紫色，右）已建立与原发结肠腺癌相似的导管组织。此外，癌细胞招募了大量的间质组织（中），包括巨噬细胞（深棕色）。（B）许多乳腺癌肝脏转移瘤（左）行为与结肠癌肝脏转移瘤大相径庭，乳腺癌细胞浸润正常肝组织（右）并替换肝细胞，因而很好地利用了现有的间质细胞，包括其血管系统。这些乳腺癌细胞与结肠癌细胞同样依赖间质细胞，但以完全不同的方式。

13.2 癌细胞在形成细胞系的过程中缺少异质性相互作用且其行为有异于体内肿瘤

癌细胞对间质支持的持续依赖给研究者试图在体外建立肿瘤灶带来极大困难。目标因此变为在体外建立肿瘤细胞系——可以体外无限传代的癌细胞。具体做法是将肿瘤活检组织标本中的癌细胞体外培养，这样生长旺盛的癌细胞能在培养皿中长出集落。然而大多数情况下，这样的集落并不能形成，且常常能够形成克隆的细胞是间质来源的——特别是成纤维细胞，培养基血清中的 PDGF 可促进生长。

有一点较为明确，即在体外培养的癌细胞的生长环境与癌细胞在患者体内肿块中生长的环境极为不同。例如，培养基中高浓度的血清对于正常和恶变细胞是生长抑制性的，而在体内除了创伤愈合时很少有如此高浓度的血清存在。更重要的是，体外被筛选出的有生长能力的癌细胞并未和间质接触，因为体外无法模拟间质细胞和上皮细胞平衡的环境。

少数情况下，癌组织标本可有恶变细胞在培养皿中形成集落，这些细胞因而无需间质支持且在无其他癌细胞庇护下形成肿瘤。实际上，许多成功建立的肿瘤细胞系均来自那些生存和增殖不再依赖间质的癌细胞（补充材料 25 ◎）。

这些肿瘤细胞系（常用有几十株）是癌症研究的标准对象。这些细胞可被植入免疫缺陷小鼠中，迅速增殖并形成肿瘤。这种肿瘤被称为**移植瘤**，因为这是将一个物种移植入另一个物种。裸鼠、NOD/SCID 小鼠以及 RAG1/2 小鼠由于缺乏免疫系统而可容忍其他物种的组织生长而被用于此类实验。这些移植瘤可用来做药物反应性测试（信息栏 13.2），然而实验结果并不能完全预测临床药效。

信息栏 13.2 利用现有人肿瘤细胞系并不能全面有效的为开发抗肿瘤疗法服务 当人肿瘤细胞系在免疫缺陷小鼠中形成移植瘤时，通常对抑制增殖的非靶向药（对正常和恶变细胞有同样效果）和只对肿瘤细胞有杀伤作用的靶向药反应敏感。然而，这样的移植瘤模型的药物反应观察结果对患者的疗效预测是有限的。在 2001 年的一项对 39 种抗肿瘤药回顾性研究中，移植瘤与临床患者对药物的反应性并不一致。例如，对 1/3 小鼠肿瘤均有高效杀伤作用的候选药物在临床上仅起到一半类似的功效（包括抑制肿瘤生长），另外部分对移植瘤模型有效果的药物在临床上几乎没有任何药效。这些失望的结果并不意外，事实上在这些模型中的人肿瘤细胞系与临床上遇见的肿瘤细胞相似点很少，因而这些细胞系形成的肿瘤在组织学上和临床病理上实验室的常见肿瘤有很大不同（图 13.8）。

另一个难题来自这些恶变细胞系通常由皮下植入小鼠这样一个事实。虽然这样使得研究者可以模拟肿瘤生长的位置，但从解剖学上这样的位置是和原发瘤完全不同的。例如，胰腺癌细胞种植于皮下可能与生长于动物胰腺时行为不一致，可能是由于这两种位置的间质环境差别很大。同样，乳腺肿瘤细胞在植入乳腺间质脂肪垫后比在其他位置形成的肿瘤在组织学上与临床肿瘤更为相似。对肿瘤干细胞的研究揭示了恶变细胞系与体内肿瘤癌变细胞的另一个不同：若常见肿瘤的构成是有层次的，即包括肿瘤干细胞和分化后自我更新能力有限的细胞，那么这样的构成是无法由体外增殖的细胞系模拟的（见 11.6 节）。

对这些难题的一种实验性解决方式是直接将肿瘤组织的一小部分植入免疫缺陷小鼠，这样可不用打断肿瘤组织的增殖。这样的移植物包括上皮和间质细胞，它们可能一起增殖并在裸鼠体内形成与原发瘤在组织学上类似的肿瘤组织（图 13.8）。

然而不幸的是，与真实人肿瘤中的癌细胞一样，这些移植物中的细胞生长非常缓慢，并且动物之间进行移植耗时耗力。这些缺点使其无法用于抗肿瘤药物筛选。

人肿瘤模型的不足以及其无法准确预测肿瘤药物的临床疗效（当这些药物被用于人体之前）迫使制药业每年花费上百亿美元，因此也成为抗肿瘤新药研发中的最大障碍。

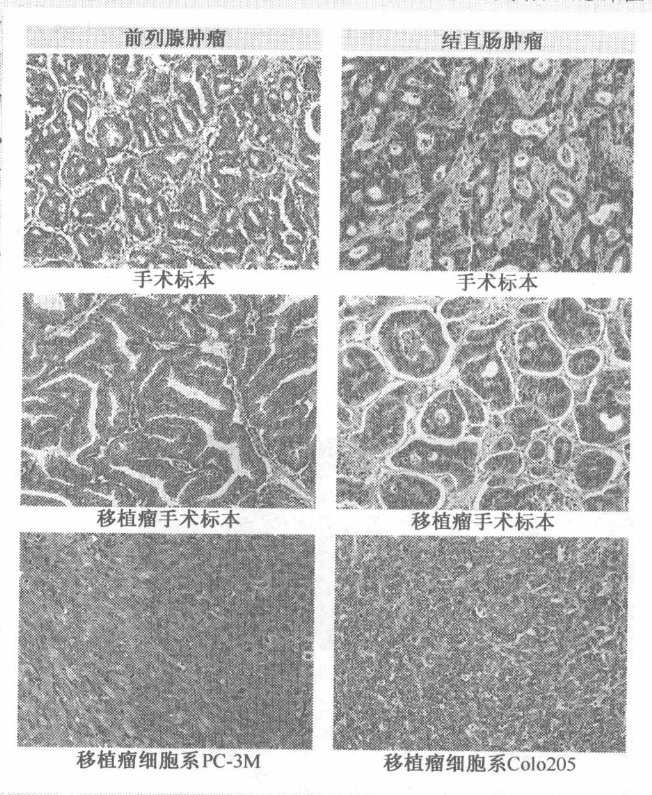


图 13.8 移植瘤细胞系及其来源肿瘤 第一行显示手术切除的原发性前列腺癌（左）及结肠癌（右）的组织图片。第二行是移植物种植于免疫缺陷小鼠的移植瘤组织图片，移植物中包括上皮和间质成分。3～6 个月接种后，移植物直径长至 2mm～1cm 时仍然保留原发瘤的结构和形态。然而，在体外强烈生长的前列腺和直肠癌细胞系在裸鼠中形成的移植瘤却在组织学上与临床肿瘤有很大区别（下排）。

13.3 肿瘤组织与不愈合的损伤组织类似

从以上的讨论我们得知，异质性信号传导决定大多肿瘤的生物学性状，而忽视此类作用的实验模型在生物学上与体内肿瘤大相径庭。我们将继续细致研究这些肿瘤内部信号的本质以及参与其中的细胞类型。实际上，这些肿瘤内异质性相互作用的信号传递非常复杂，涉及许多信号分子在不同细胞间的交换。更重要的是，许多正常组织中是不存在这样的信号转导的，因此这样的信号转导看来是肿瘤特异性的。

信号转导的复杂性引出一些原则性的问题：肿瘤细胞是怎样学会释放和应答这样一系列异质性信号的？复杂的信号转导程序及其引起的生物应答是肿瘤在进化过程中逐渐获得的？还是肿瘤仅仅利用了正常组织中预存的程序？

早在 1986 年就出现了对这些问题一个颇具吸引力的解释。有研究者在观察肿瘤组织和愈伤组织结构时，注意到许多信号转导在肿瘤发展和伤口愈合时有惊人的相似性。若这种相似性可被证明的话，则说明癌细胞只不过是激活了复杂而普通的生理过程——伤口愈合，这种已经存在于基因组中的程式。这样癌细胞就无需在每次形成癌巢时重新建立信号转导途径。

伤口愈合过程已被研究得非常深入，当皮肤形成创伤时，血小板凝集并释放一些分子，包括血小板衍生生长因子（PDGF）和转化生长因子-β（TGF-β，图 5.3）。伤口会释放**血管活性**因子，该分子可增加伤口附近血管的渗透性，这帮助伤口从血浆中得到纤维蛋白原，纤维蛋白原转化为纤维蛋白成为血块的支架（图 13.9）。成簇的纤维蛋白缠绕在血小板团块周围起止血作用。

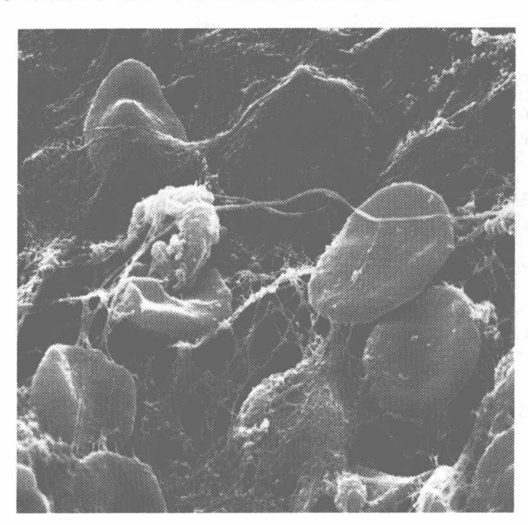


图 13.9　血块扫描电镜照片　这张赋色的扫描电镜照片显示血块由密集的纤维蛋白（浅棕色）包裹血小板（红色）构成。血小板凝结之前被激活并分泌图 5.3 中的颗粒。

血小板释放的 PDGF 能吸引成纤维细胞并刺激其增殖（图 13.10）。随后血小板衍生的 TGF-β 激活这些成纤维细胞并诱导其分泌一类称作**基质金属蛋白酶**（MMP，表 13.1）的蛋白酶。与大多数催化结构域中含有丝氨酸的蛋白酶不同，MMP 通过锌离子帮助其催化，而且因锌离子而得名。被激活的成纤维细胞还释放有丝分裂原，如各种成纤维细胞生长因子（FGF），此类因子能刺激特定上皮细胞的增殖。

一旦释放后，MMP 开始降解胞外基质中的特定成分（ECM，表 13.1），并导致两种主要结果：一方面使 ECM 结构重塑，为新的细胞留出空间；另一方面导致许多黏附于 ECM 上且处于未激活状态的生长因子的释放，这些因子随后被激活，其中包括成纤维细胞生长因子（bFGF）、TGF-β、PDGE、EGF-相关因子和干扰素-γ（IFN-γ）。另外，几乎每种 MMP 都发现对多种胞外空间的非

ECM 蛋白起作用，这些底物中包括潜在蛋白酶原，当被 MMP 切割后成为**有活性**的形式。

表 13.1　一些基质金属蛋白酶和它们的细胞外基质底物

MMP 名称	别称	细胞外基质底物[a]
MMP-1	胶原酶-1	各种胶原、明胶、内功素、聚集蛋白聚糖、黏蛋白
MMP-2	明胶酶 A	弹性蛋白、纤维连接素、各种胶原、层粘连蛋白、聚集蛋白聚糖、玻璃粘连蛋白
MMP-3	间充质溶解素-1	蛋白多糖、层粘连蛋白、纤维连接素、明胶、各种胶原、人纤维蛋白原、内功素、黏蛋白、玻璃粘连蛋白
MMP-7	基质溶解因子	同 MMP-3
MMP-9	明胶酶 B	同 MMP-2
MMP-11	间充质溶解素-3	失活丝氨酸蛋白酶抑制剂

a 除了以 ECM 作为底物外，大多数 MMP 也可酶解其余一些细胞外基质中的底物。例如，有报道 MMP-3 可水解 HB-EGF 前体、IL-1β 前体、纤溶酶原、E 钙黏附蛋白、IGFBP-3、α1-抗糜蛋白酶、α1-蛋白酶抑制剂、MMP1、3、7、8、9、13 前体和 TNF-α 前体。

摘自 L. J. McCawley and L. M. Matrisian，Curr. Opin. Cell Biol. 13：534-540，2001.

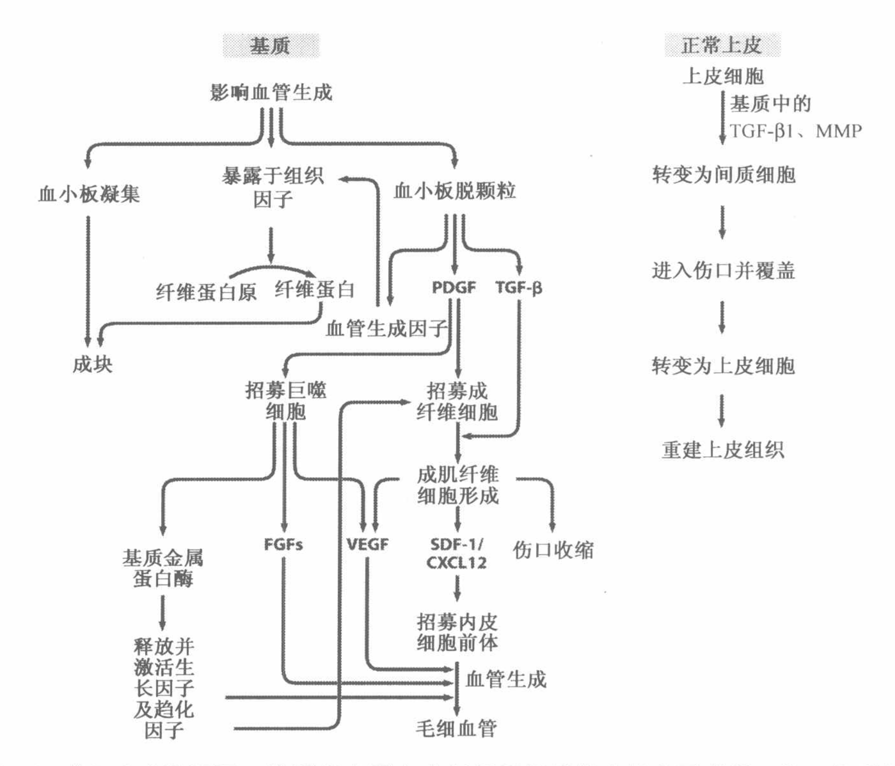


图 13.10　伤口愈合流程图　该图指出了上皮组织受损后发生的主要事件。伤口基质部位（左）发生的许多改变旨在重建间质并为上皮层（右）的重建提供基础。

血小板释放的和 ECM 游离的生长因子随后吸引**单核细胞**、巨噬细胞和另一种被称为中性粒细胞的吞噬细胞从侵入伤口的位置（其他类型的免疫细胞，包括**嗜酸性粒细胞**、**肥大细胞**和**淋巴细胞**也被招募至伤口）。这些细胞清理伤口并清除外来物质、细菌及组织碎片，同时释放并激活促有丝分裂因子，如成纤维细胞生长因子（FGF）、血管内皮细胞生长因子（VEGF，见 7.12 节）。以上因子刺激内皮细胞增殖并构成新的毛细

血管——即**血管生成**的过程（有时称为**新血管生成**）。

当这些事件在愈伤间质部位发生时，此处的上皮细胞也在进行自我更新。其目标是重建位于伤口前的上皮层。为此上皮细胞减少其与ECM、特别是基底膜（2.2章和图2.3）的黏附。切断这种黏附后，上皮细胞的自由度大增（图13.5和图13.11）。

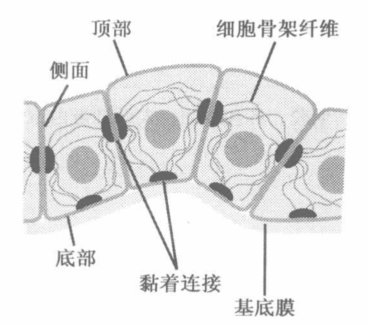


图13.11　上皮细胞的组织黏附　上皮细胞底部锚定于基底膜（黄色），侧面与相邻上皮细胞黏附，这样的黏附由几种不同的连接形式（锚定连接）形成，它可将相邻细胞骨架（绿线）连在一起；这些细胞骨架包括肌动蛋白和微管组分。

上皮细胞之间的相互接触也被切断。这类黏附部分是通过**黏着斑**形成的（图13.12），上皮细胞的E-钙黏蛋白分子组成此结构并将细胞膜一个个联系在一起。愈伤组织周围的上皮细胞中E-钙黏蛋白表达降低并常常被替换为N-钙黏蛋白，这是一种正常情况下由间质细胞和成纤维细胞表达的细胞黏附分子。这些N-钙黏蛋白虽在结构上与E-钙黏蛋白相近，却因其相互作用很弱而不能在上皮细胞间形成黏着斑。

当表达不同的细胞表面钙黏蛋白后，处于愈伤组织周边的上皮细胞发生形态学改变，使其呈现出成纤维细胞的外观（图13.13），这种改变被称作**上皮间叶细胞转换**（EMT），该转换使得上皮细胞具有浸润侵袭性，此特性使上皮细胞游走入伤口部位，并填充伤口产生的组织损伤缺口。

愈伤组织处的间质细胞帮助上皮细胞发生EMT。间质细胞分泌的基质金属蛋白酶释放并激活储存在胞外基质中的生长因子如TGF-β1。这些生长因子可通过某种未被阐明的机制启动并增强EMT程序。更重要的是，EMT仅是细胞形态暂时性的改变。

当这些细胞到达位置并覆盖伤口后，它们将启动逆向程序重建上皮组织，这样的程式被称为**间叶上皮细胞转换**（MET）。当伤口愈合完全后上皮组织内的细胞不留有任何间质细胞的痕迹。

当我们将这一过程（图13.14）同肿瘤细胞与相邻基质细胞的相互作用相比较，就可发现伤口愈合和肿瘤发生极为相似。其中一个比较明显的相似处是肿瘤相关间质中存在纤维黏结块。与正常组织不同，肿瘤组织中的毛细血管是组成性渗漏的（图13.15A）。在后续的章节中，我们将讨论渗漏的原因。现已证实，毛细血管壁和**小静脉壁**的通透性使得血浆中的纤维蛋白原分子直接接触肿瘤细胞，并通过一系列中间反应促使纤维蛋白原转化为纤维蛋白，形成成束的纤维（图13.15B和C）。

很多类型的肿瘤细胞（包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌和肺癌中的肿瘤细胞）都连续释放高水平的PDGF。这与伤口愈合过程相反，在伤口处，血小板在形成最初的血凝块时突然大量释放PDGF。但与伤口愈合过程相同的是，由癌细胞产生的PDGF靶点都是表达PDGF受体的间质细胞，包括平滑肌细胞、成纤维细胞和巨噬细胞。对于间质细胞，PDGF同时起到诱导物和有丝分裂原的作用，可能是癌细胞招募并刺激间质细胞增殖的重要信号分子。例如，在乳腺癌中，PDGF的表达水平通常随肿瘤的进展而升

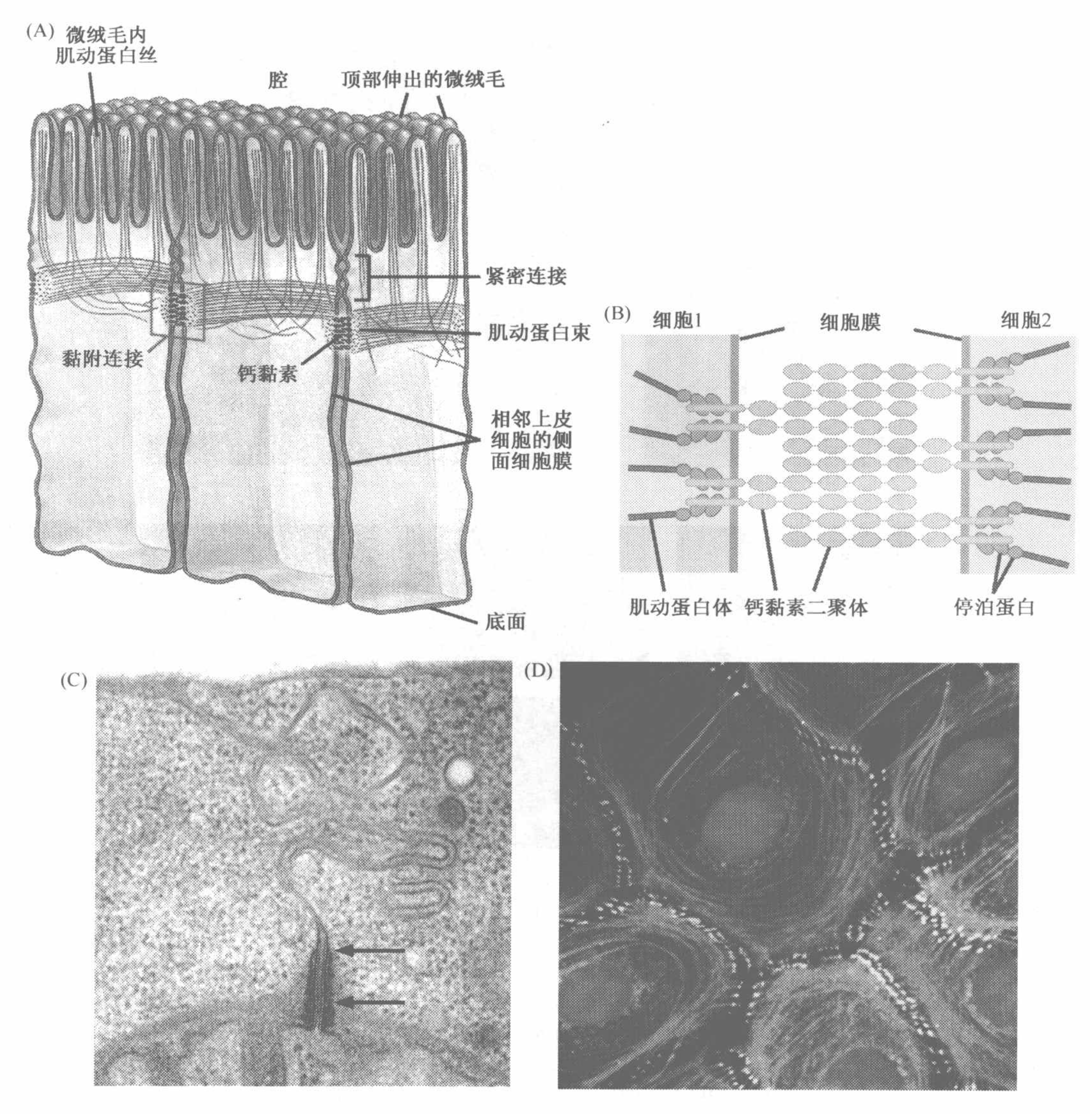


图 13.12 黏着连接 （A）该图描绘了相邻上皮细胞侧面由黏着连接形成的黏着带。E-钙黏蛋白在许多上皮细胞中负责形成这些黏着连接。（B）更具体的，这类细胞连接依赖两个邻近细胞表面钙黏蛋白分子的寡聚化。E-钙黏蛋白（绿色）在此过程中起着关键作用。（C）从此透射电镜照片可见，两相邻细胞侧面形成黏着连接（黑色箭头），该连接形成了秀丽隐杆线虫的肠内层组织。同样结构同样见于哺乳动物细胞。（D）该免疫荧光图片显示了相邻角质化细胞侧面的相互作用。E-钙黏蛋白“拉链”（黄色）在相邻细胞间形成黏着连接，钙黏蛋白通过其胞质端相连并借助其他中间蛋白连到肌动蛋白骨架上（红色）。细胞核被染为蓝色。

高，这可以解释多数晚期肿瘤高度**间质化**的现象。

癌细胞释放的PDGF首先招募成纤维细胞进入纤维蛋白基质。同时，招募来的成纤维细胞通过整联蛋白附着在纤维蛋白基质的骨架上，并可以在其上迁移。侵入的间质细胞通过降解许多最初形成的纤维蛋白分子，并用一种由皮纤维细胞分泌的胶原组装成的更为永久性的基质替代它们，从而重塑这一“临时性的基质”。这与在伤口愈合的有

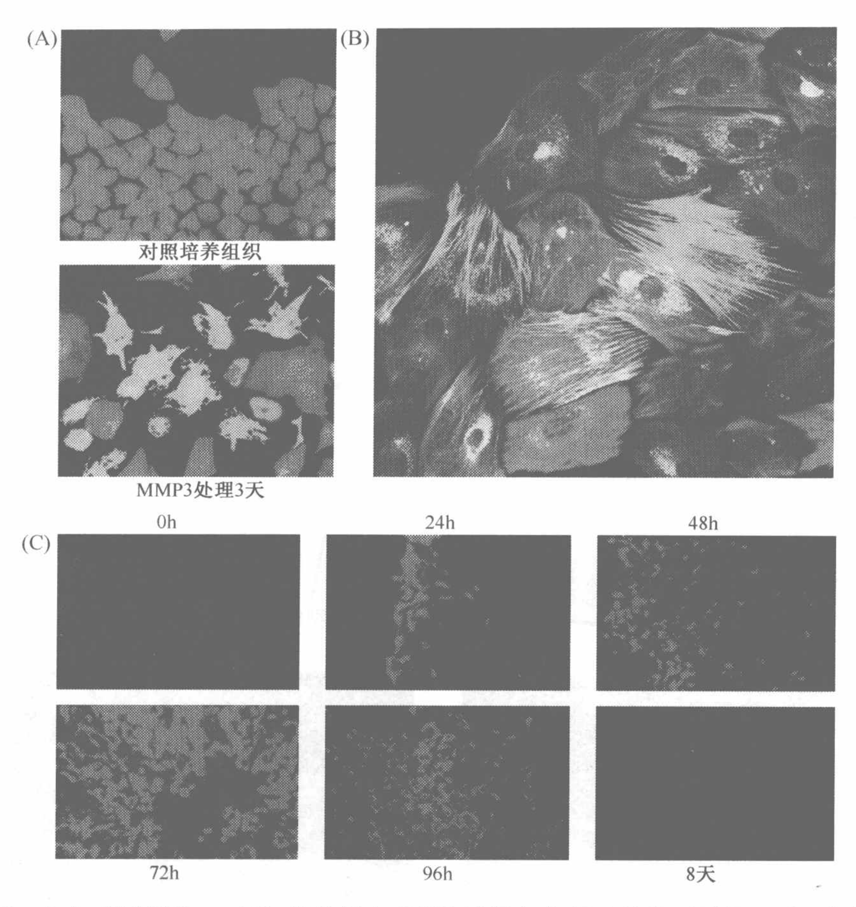


图 13.13 上皮-间叶转换 （A）当单层上皮细胞进行上皮-间叶转换（EMT）时，它们会停止表达许多上皮细胞标志物，如细胞角蛋白（红色）和 E-钙黏蛋白，并开始表达间叶细胞蛋白，如波形蛋白、纤维结合素和 N-钙黏蛋白。此外这些细胞的形状还由多边形（顶部）转变为成纤维细胞的形态（底部），且常常因此获得侵袭浸润性。该图中 EMT 是在暴露于基质金属蛋白酶-3（MMP-3）3 天后产生的，因为 MMP-3 能过度降解 E-钙黏蛋白，从而刺激 EMT 的发生。（B）在某些细胞类型中，单个细胞也可能自发由表达细胞角蛋白（红色）的上皮细胞形态转变为表达平滑肌蛋白纤维的间叶细胞形态（绿色）。这反映了细胞在胚胎发育时期常见的可塑性。（C）MCF10A 单层细胞，这是非恶变永生化人乳腺上皮细胞系（MEC），该单层细胞被去掉了一小部分（每张图的左侧被去除）。最初这些细胞不表达波形蛋白。然而当该单层细胞受损后，伤口边缘的上皮细胞即进行 EMT，表达波形蛋白（这是间叶细胞的特征），并向伤口移动进而填充伤口。8 天后，当单层细胞恢复完全，这些细胞重新转变为上皮细胞形态并停止表达波形蛋白（间叶-上皮转换，MET）。

序性过程一致。

在伤口愈合过程中，间质细胞的任务之一是使伤口边缘收缩从而闭合伤口。收缩是由一类称作成肌纤维细胞的特殊成纤维细胞调节，其表达 α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）并且可利用肌动蛋白-肌球蛋白收缩系统产生伤口闭合所需的机械张力（图 13.16A）。成肌纤维细胞同样在慢性创伤中出现，即那些持续发炎的组织（图 13.16B）。在大多数晚期肿瘤的间质中也存在大量此类成肌纤维细胞（图 13.16C～E）。

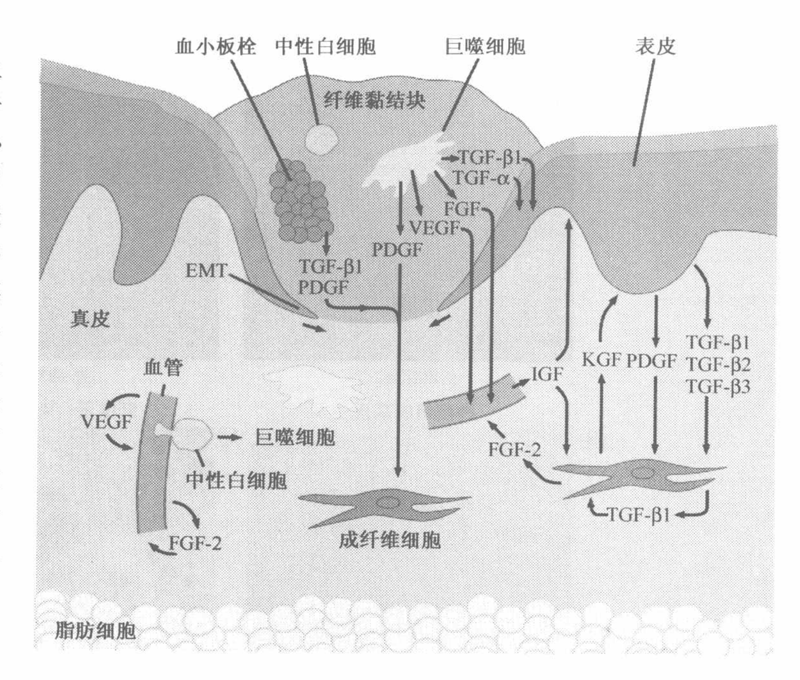


图 13.14　伤口愈合过程　此图概述了皮肤（典型的上皮组织）受损后的异质信号传递过程。首先，运送血小板的纤维素凝块填充于伤口处。伤口愈合过程的前三天有时被称为炎症期，因为多种与炎症相关的细胞参与其中，特别是中性粒细胞和单核细胞，这些细胞的作用是清除细胞碎片、凝块和外来的细菌等。此外，由单核细胞分化而来的巨噬细胞释放 TGF-β1 和 TGF-α，这些因子可刺激附近表皮来源的上皮细胞增殖，并诱导其向间叶细胞转化（epithelial- mesenchymal transition，EMT）。这些细胞的凸出部分（呈现出间质细胞的行为）在血凝块的下方从两侧伸展以覆盖伤口。同时在最初血凝块形成过程中血小板释放的 TGF-β1、PDGF-A 和 PDGF-B 可促进真皮间质中的成纤维细胞增殖，诱导其转变为成肌纤维细胞（图中未标出）。成肌纤维细胞有收缩能力，可以使伤口并拢在一起。成肌纤维细胞还可以释放血管生成因子，主要有 VEGF 和 FGF-2，刺激伤口边缘下方间质生成新的血管。最后，当受损的间质被填补之后，先前经历过 EMT 转换的细胞再通过 MET（mesenchymal - epithelial transition）过程由间叶细胞恢复成为上皮细胞，重新形成上皮组织（图中未标出）。（From A. J. Singer and R. A. F. Clark，N. Engl. J. Med. 341：738-746，1999.）

一些肿瘤相关的成肌纤维细胞可能来自正常间质的成纤维细胞。事实上，TGF-β1 在体外可诱导正常的成纤维细胞成为成肌纤维细胞，这提示许多类型的癌细胞，尤其那些正在向更高恶性程度进展的癌细胞所分泌的 TGF-β1，是肿瘤相关间质中成肌纤维细胞的主要诱因。在伤口愈合过程中，TGF-β1 的主要来源是血小板，如前所述，血小板在参与血凝块形成时分泌大量的 TGF-β1。很多间质成肌纤维细胞和成纤维细胞的来源尚不清楚（信息栏 13.3）。

信息栏 13.3　成纤维细胞和成肌纤维细胞可能从远处招募而来　间质成纤维细胞和成肌纤维细胞的来源还不十分清楚。在伤口愈合时成纤维细胞最初来自邻近正常组织的间质：成肌纤维细胞可由这些招募来的纤维母细胞分化而成。然而另一种有趣并被严密证明的可能是，伤口处大量的成纤维细胞和成肌纤维细胞是来自那些募集而来的纤维细胞——血液中分化较差、可产生胶质原的前体细胞。目前已知纤维细胞起源于骨髓，能够聚集在组织损伤处并分化为成肌纤维细胞和成纤维细胞，进而促进间质的快速重建。这确保大量细胞可从发源处快速游走至伤口并重建间质。这里所描述的伤口愈合与肿瘤发生的相似点暗示了纤维细胞在肿瘤相关间质的建立中也起重要作用。

成肌纤维细胞形成的肿瘤间质与正常上皮组织间质在外观上有着很大区别，基于这

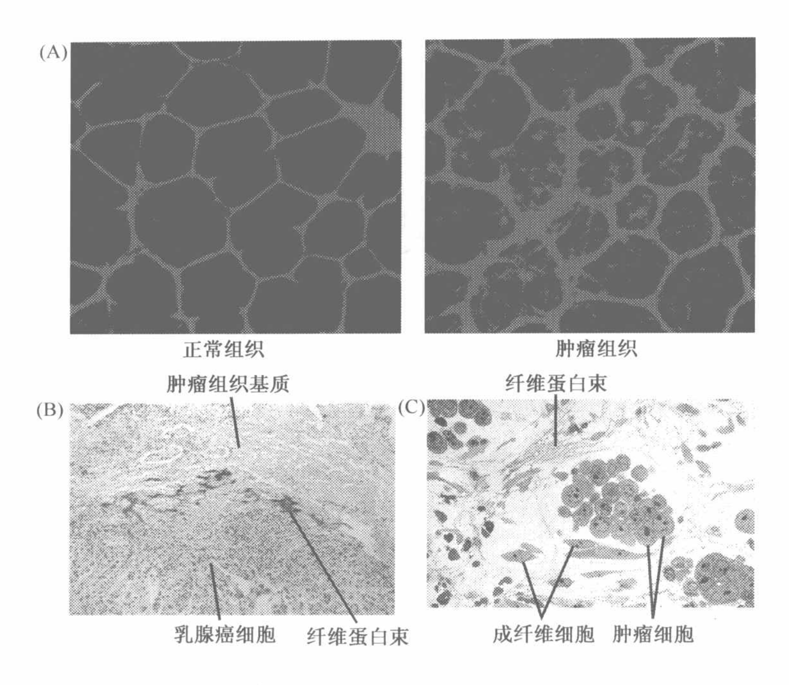
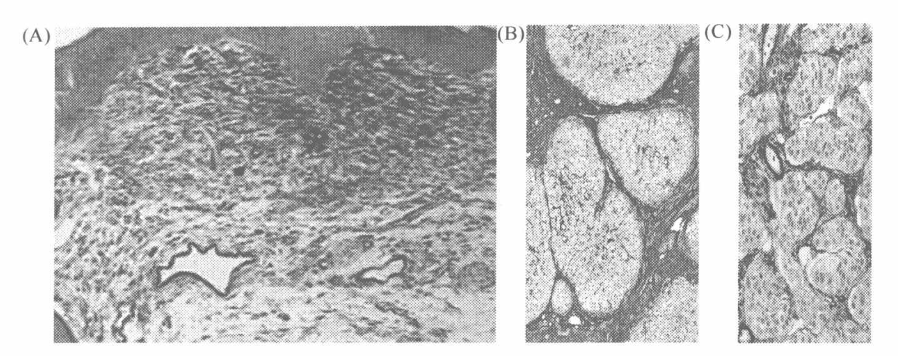


图 13.15 肿瘤相关间质中毛细血管渗漏和纤维素束沉积 （A）在正常微血管系统中注射红色葡聚糖染料，结果发现毛细血管壁通透性较低（如左图所示），因为其血管壁较光滑。然而，当在肿瘤相关血管中注射染料，染料渗漏并弥散到周围的实体组织中（如右图所示），造成血管壁边缘模糊。(B) 肿瘤组织中，血管的渗漏导致凝血酶和纤维蛋白原分子持续从血浆进入周围软组织中。凝血酶在接触到组织因子（位于癌细胞和许多其他类型细胞表面的蛋白质）之后被激活，将纤维蛋白原转变成纤维蛋白。从而导致在活跃增殖的乳腺癌细胞（下）和肿瘤间质（上）之间广泛形成纤维束网络（暗红色）。(C) 纤维束（在成簇肿瘤细胞的左上方）形成了可供迁移细胞附着的细胞外基质，如成纤维细胞（在成簇肿瘤细胞下方）和内皮细胞（未显示），这些细胞可在纤维束上运动。在很多肿瘤，如豚鼠肝胆管癌中，纤维蛋白基质最终会被纤维蛋白的溶解所溶解，并被一种胶原基质取代。(A，courtesy of R. Muschel；B，from C. G. Colpaert，P. B. Vermeulen，P. van Beest et al.，Histopathology 42：530-540，2003；C，from H. F. Dvorak，Am. J. Pathol. 162：1747-1757，2003.)

一特征性的外观，病理学家将其称为“反应性的”或**促结缔组织增生**的间质。后一名称说明，由于成肌纤维细胞的作用造成广泛的细胞外基质沉积，导致肿瘤硬块的形成。在肿瘤向更高级别、更具侵袭性发展的过程中，促结缔组织增生间质的比例也在增加（图 13.17）。

成肌纤维细胞通过分泌大量的 I 型和 III 型胶原、纤维结合素、蛋白多糖以及葡萄糖胺聚糖（GAG），共同构成促结缔组织增生的间质，这些分子使间质在显微镜下具有特征性的外观。此外，成肌纤维细胞分泌尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂（uPA，一种蛋白酶）和一系列基质金属蛋白酶，它们有助于动员原来在 ECM 中静止的生长因子。随着促结缔组织增生间质的成熟，许多起始间质细胞消失，逐渐被浓密的、非细胞的、胶



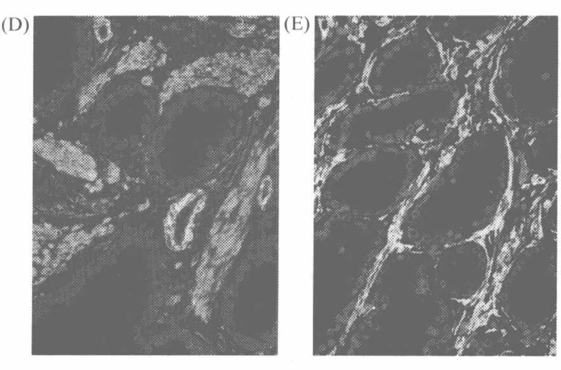


图 13.16 成肌纤维细胞 成肌纤维细胞出现在伤口附近和肿瘤相关间质中，是通过间质成纤维细胞的转分化（transdifferentiation）和招募循环中的成肌纤维细胞前体形成的。通过抗原染色的方法检测 α-SMA 的表达可显示成肌纤维细胞的存在。（A）小鼠皮肤受伤后 3 天出现大量 α-SMA 阳性成肌纤维细胞（红褐色）。（B）慢性炎症组织中出现纤维化间质。如图所示，在硬变肝组织中，用抗 α-SMA 抗体进行染色，可以观察到大量成肌纤维细胞（棕色）。（C）用抗 α-SMA 抗体对肝细胞癌进行染色（棕色），发现在该组织中慢性炎症组织间质和肿瘤组织间质的染色结果相似。（D）人正常前列腺腺体中有大量平滑肌细胞表达 α-SMA（绿色）。与成肌纤维细胞不同，平滑肌细胞弹性蛋白染色阴性（红色）。图中所示的少数同时表达两种蛋白的区域（黄色）是偶尔出现在血管周围的周细胞。上皮细胞核被染成蓝色。（E）相反，在前列腺癌，间质中充满了同时表达弹性蛋白（红色）和 α-SMA（绿色）的成肌纤维细胞，二者同时表达呈现黄色。上皮细胞核呈蓝色。（A，from P. Martin，D. D'Souza，J. Martin et al.，Curr. Biol. 13：1122-1128，2003；B and C，from A. Desmouliere，A. Guyot and G. Gabbiani，Int. J. Dev. Biol. 48：509-517；D and E，from J. A. Tuxhorn，G. E. Ayala，M. J. Smith et al.，Clin. Cancer Res. 8：2912-2923，2002.）

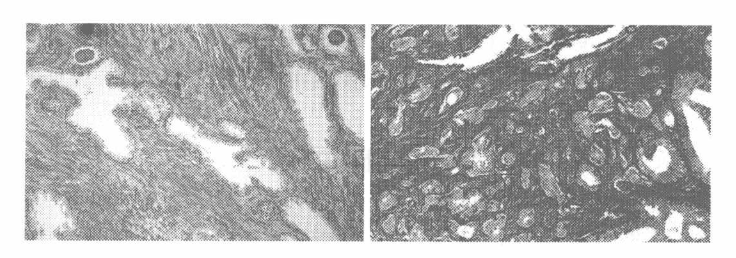


图 13.17 正常组织和增生组织间质的显微照片 正常组织中组织学复杂的间质可能最终被晚期肿瘤的增生间质代替。本图为 Masson 三色染色的正常人前列腺组织（左），显示间质中大量粉色平滑肌细胞以及弥散分布的正常导管。与之相对，同样染色的晚期前列腺癌（右）显示在胞外基质中大范围的增生间质（蓝紫色），特别是 I 型胶原蛋白。前列腺癌细胞岛组成的导管（粉色）散在分布于增生间质，此组织中明显缺少活跃的细胞，如成纤维细胞和成肌纤维细胞。

状的肿瘤相关间质所特有的 ECM 所代替。导致肿瘤相关的促结缔组织增生间质形成的过程与伤口愈合的过程相似。然而，在肿瘤中这一过程数月、数年地持续发生，而不是像伤口愈合时仅在几天内发生。

一些研究发现，伤口愈合与肿瘤发生具有相似点，这暗示可以抑制肿瘤血管生成的物质也可以阻碍伤口愈合。这些抗血管生成物包括一些可溶性的生长因子受体抑制剂，这些受体同时也是 ECM 的成分，在血管生成中起重要作用，被称为血小板反应素-1（TSP-1），是一种潜在的抗血管生成分子。这些伤口愈合和肿瘤组织中表皮-间质相互作用所共有的机制对临床治疗也有意义（信息栏 13.4）。

信息栏 13.4　乳腺癌手术治疗可能会刺激肿瘤生长　流行病学研究显示乳腺癌患者手术切除原发肿瘤（如部分或全部乳腺切除）3 年内在原位和远处器官的复发概率达到高峰。从复发的间隔时间推测，手术切除肿块可能是诱因。分析术后伤口引流液显示其中含有潜在的促有丝分裂因子，与伤口愈合有关。这些因子可促进乳腺癌细胞、特别是高表达 HER2/Neu 蛋白的癌细胞进行有丝分裂。此外，伤口愈合时合成大量血管内皮生长因子（VEGF），可刺激肿瘤血管生成（在本章后面讨论）。因此，手术可能对术中切除原发肿瘤时未能检测到的残余微小转移灶（小量转移细胞）的增殖有刺激作用。确实，有人提出手术引起的临床复发使得原发瘤以及局部淋巴结切除带来的效果大打折扣。手术引起的肿瘤复发的重要性目前仍有很大争议。

另一个与此相对的临床现象是：当术后对肿块较小的低级别乳腺癌患者使用赫赛汀（一种抑制 HER2/Neu 的单克隆抗体，见 15.19 节）时，临床复发率可降低 50%。这一惊人的疗效可能与赫赛汀可遏制手术后伤口愈合过程中产生的生长因子对残存癌细胞的刺激有关。

“肿瘤相关成纤维细胞”（CAF）常用来描述在上皮性肿瘤间质中存在的成纤维细胞和成肌纤维细胞。分析 CAF 的基因表达情况表明这些细胞与伤口处的成纤维细胞十分相似。此外，这些研究还提示 CAF 在肿瘤进展中发挥关键作用。

这些研究首先明确了在体外接受血清刺激后成纤维细胞的基因表达谱，即用高浓度的血清刺激已被血清饥饿的成纤维细胞。这样的刺激能模拟伤口愈合初期成纤维细胞的环境（此时激活的血小板释放多种血清因子，激活伤口处的间质成纤维细胞，将其至少暂时转化为成肌纤维细胞）。这些资料揭示了一小部分血清诱导和抑制基因，这些基因可视为被血清刺激的成纤维细胞的特征性“基因表达谱”（signature）（图 13.18A）。

因此，对大量人类癌症中 RNA 的表达模式进行了分析，在每一病例中都检测该肿瘤是否表达血清刺激后成纤维细胞的基因表达谱（由于所有被分析的基因都与成纤维细胞明确相关，所以这些分析必然反映了各个肿瘤中 CAF 的 RNA 表达模式）。在很多癌中确实检测到血清刺激后成纤维细胞的基因表达谱。重要的是，表达该基因表达谱的癌症与不良临床预后有着更紧密的相关性（图 13.18B 和 C）。这一相关性提示活化的、富含成肌纤维细胞的间质（代表了一股能够促进侵袭性肿瘤进展的势力）具有促进侵袭性肿瘤进展的能力。

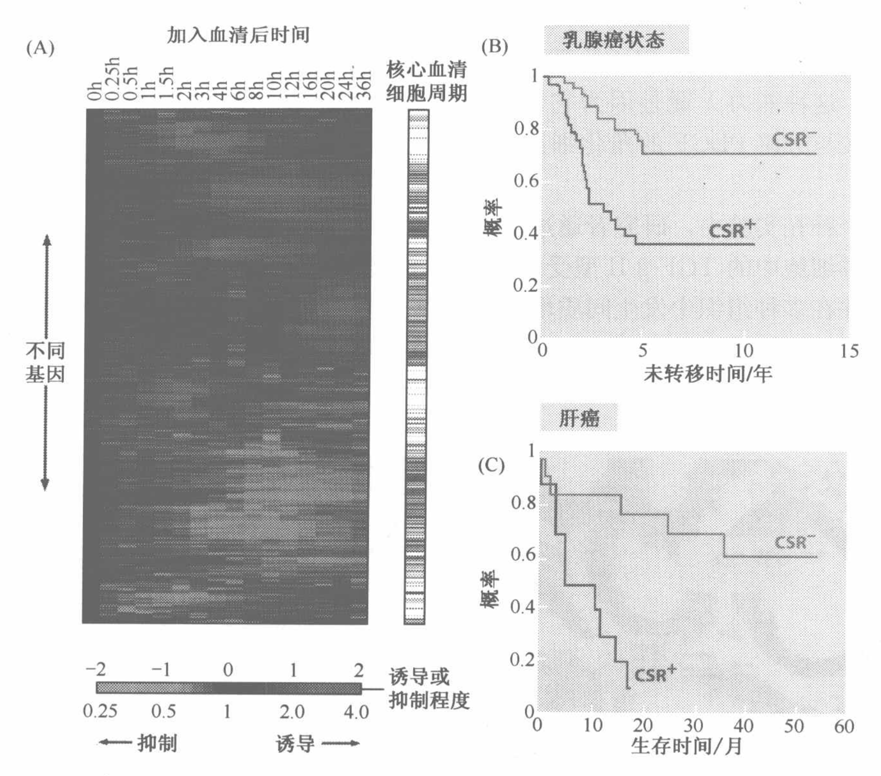


图 13.18 肿瘤相关成肌纤维细胞和血清活化的成纤维细胞的基因表达谱 一个细胞群体或组织中的表达谱分析通常称为功能基因组学。(A) 在这个基因表达分析中，将血清添加至之前静止的、血清饥饿的人类成纤维细胞中，分析其 mRNA 的表达。这种处理导致细胞进入活跃的细胞周期，诱导或抑制一大批基因的表达。添加血清后在不同时间检测基因的表达。被分析基因的队列从上至下垂直排列。在添加血清后被诱导或抑制的基因被归为“细胞周期基因”(右侧垂直条中橘色的线)，而那些早期被诱导或抑制、在细胞周期中不变的基因被归为“核心血清反应基因”(CSR)(右侧垂直条中的蓝线)。下面的水平条是加入血清后诱导(红)或抑制(绿)程度的标志，水平条上方的数字是诱导或抑制倍数的对数值，下方的数字是真实值(诱导 4 倍以上或抑制 4 倍以下的基因在此简单地记为诱导 4 倍或抑制 4 倍)。(B) 一组患有 I 期(即早期)乳腺癌的女性中 CSR 基因表达模式的分析。如图所示，与没有显示这一基因表达谱的肿瘤(蓝线)相比，表达 CSR 基因谱(红线)的肿瘤在最初治疗后的几年里发生转移的可能性更大。(C) 与此相似，显示 CSR 基因表达谱的肺腺癌(包括在诊断时肿瘤进展的所有阶段)患者(红线)，与那些没显示这一基因表达谱的患者(蓝线)相比死亡率显著升高。(From H. Y. Chang, J. B. Sneddon, A. A. Alizadeh et al., PLoS Biol. 2: E7, 2004.)。

13.4 间质细胞的活化促进肿瘤发生

一些生物学实验为募集的间质细胞对上皮细胞肿瘤的发生有重要影响提供了更直接的证据。在一项研究中，通过导入 PDGF 表达载体使原来非致瘤性的、永生化的角化

细胞强制分泌高水平的 PDGF。释放的生长因子在体外对这些细胞的增殖并没有影响，因为它们的表面没有表达 PDGF 受体。然而，当这些细胞被植入宿主鼠体内时，它们增殖旺盛，这种能力无疑是因为它们可以释放 PDGF 以招募并激活间质细胞。然后，间质细胞又与分泌 PDGF 的角化细胞相互作用，并促进其增殖，最终引发后者的恶性转化。

在一个补充实验中，研究者通过基因工程手段改变小鼠种系，选择性灭活各种组织间质成纤维细胞中的 TGF-β II 型受体，结果导致间质细胞对 TGF-β 介导的生长抑制不再敏感，并在多种组织中发生间质增生。其中一些过度增殖的成纤维细胞促进附近上皮细胞层增殖，最终形成癌（图 13.19），再一次证明间质细胞有刺激上皮细胞增殖的能力，并导致上皮细胞的致瘤转化。

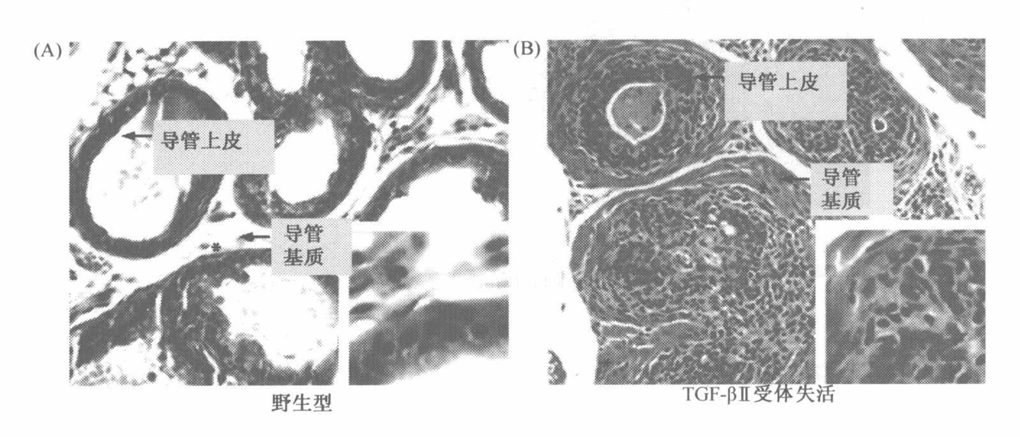
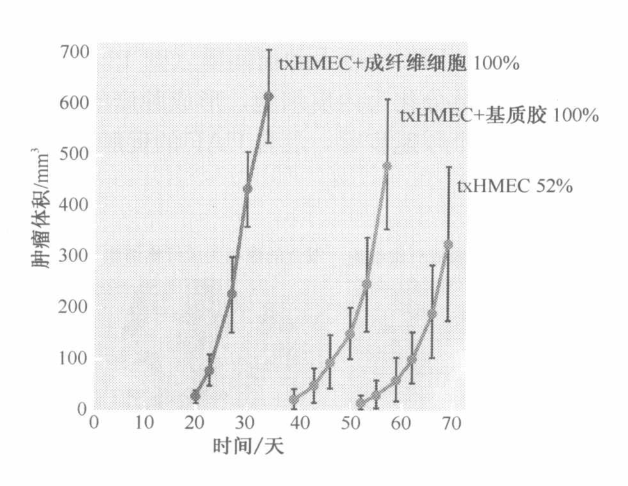


图 13.19　间质成纤维细胞发生遗传改变的小鼠形成的前列腺肿瘤　小鼠各种上皮组织的成纤维细胞中的 TGF-β II 型受体编码基因被选择性灭活。(A) 正常雄性小鼠的前列腺管腔内层有一层薄的上皮细胞，并且在上皮细胞层的外侧有一层较薄的间质细胞（*）。(B) 间质成纤维细胞的 TGF-β II 型受体失活导致这两种细胞层的增生。上皮细胞很快产生非常类似于人类中常见的前列腺上皮内瘤变（PIN，见图 13.40），这说明增生的间质释放增殖信号至附近的上皮。的确，间质细胞在失去对 TGF-β 抑制作用的反应后，肝细胞生长因子（HGF，一个潜在的上皮细胞有丝分裂原）的产生增加了 3 倍。这些小鼠的胃间质中 TGF-β II 型受体被灭活，形成不典型增生的上皮，并能很快演进形成癌。嵌入的小图为高倍放大的图像。(From N. A. Bhowmick, A Chytil, D. Plieth et al., Science 303: 848-851, 2004.)

间质成纤维细胞在支持肿瘤生长中的重要作用可被另一类实验证明：转化的、弱致瘤性人乳腺上皮细胞（MEC）植入免疫缺陷的宿主小鼠体内需要 2 个月以上才能形成肿瘤（图 13.20）。然而，如果注射前将这些细胞与来自正常乳腺组织的人乳腺间质成纤维细胞混合，只需 1/3 的时间即可形成肿瘤。这些混合的成纤维细胞明显地缩短了 MEC 从宿主小鼠招募成纤维细胞所需要的时间（通常这一过程需要数周的时间）；缺乏这些成纤维细胞，肿瘤不能生长。

有一个问题上述实验未能回答，即正常上皮组织的间质细胞加速肿瘤形成的效率是否与癌间质细胞相同。这个问题可通过比较提取自正常上皮组织的间质成纤维细胞与提取自癌组织（富含成肌纤维细胞）的成纤维细胞（CAF）的行为得以回答（图 13.16）。

图 13.20 混合的成纤维细胞和肿瘤的生长 将 SV40 的 *hTERT* 基因及一个弱表达的 *ras* 癌基因（11.12 节）导入人类乳腺上皮细胞（HMEC）使其转化，导致转化的 HMEC（txHMEC）细胞形成肿瘤，尽管在注射后有一个较长的潜伏期，并且只占注射小鼠（橘色曲线）的一半。当注射宿主小鼠之前将这些细胞与成纤维细胞产生的细胞外基质的制备物混合，可使这种缓慢的发展稍微加快并使肿瘤形成的效率加倍（蓝色曲线）。然而，在注射前将来自正常人乳腺的间质成纤维细胞与转化的人 MEC 混合，则癌细胞以 100%的效率快速形成肿瘤（红色曲线）。这说明在肿瘤形成过程中间质成纤维细胞的招募是重要的限速步骤。(From B. Elenbaas，L Spirio，F. Koerner et al.，Genes Dev，15：50-65，2001.)



在一系列实验中，成纤维细胞纯化自正常人前列腺的间质，而 CAF 来自人前列腺癌的间质。每个细胞群体与另外的非致瘤性的、SV40 大 T 抗原永生化的人前列腺上皮细胞混合，然后植入免疫缺陷的裸鼠。结果总结于图 13.21，这些混合组织移植物的生长有显著差别，特别是含有 CAF 加永生化前列腺上皮细胞的移植物形成的肿瘤，比正常人前列腺成纤维细胞加永生化的前列腺上皮细胞形成的肿瘤大 500 倍（当单独注射时，CAF 根本不形成肿瘤）。

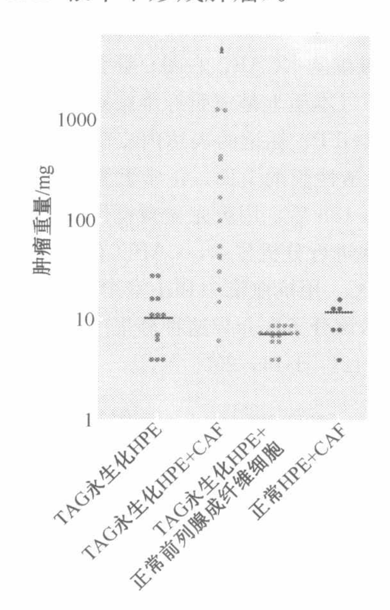


图 13.21 前列腺间质细胞对永生化的前列腺上皮细胞的作用 将被 SV40 T 抗原永生化的正常人前列腺上皮细胞（prostate epithelial cell，HPE）（Tag 永生化的 HPE）植入裸鼠体内，经过数周后它们生长到约 10mg，与初始接种物（红点）相比没有显著增大。然而，同是这些细胞与人前列腺癌相关成纤维（CAF）细胞混合后（Tag 永生化的 HPE ＋ CAF），可形成肿瘤，并且其重量的中位值是前者的 10 倍（蓝点）。相反，当这些 T 抗原永生化的上皮细胞与正常人前列腺间质成纤维细胞混合，接种物的重量中位值约 7mg，可能甚至少于初始接种物的重量（黄点）。如果在接种前将 CAF 与正常人前列腺上皮细胞混合，则数周后中位重量仍然也只有约 10mg（紫点）。(From A. F. Olumi，G. D. Grossfeld，S. W. Hayward et al.，Cancer Res. 59：5002-5011，1999.)

该实验证明，这些 CAF 在功能上与正常前列腺组织中的间质成纤维细胞有很大的不同。在肿瘤演进过程中，间质细胞对邻近上皮的存活和增殖起到越来越重要的作用。从人乳腺癌提取的 CAF 也得到了相似的观察结果。

上述实验仍然不能精确地揭示富含成肌纤维细胞的 CAF 群体是如何加速肿瘤生长的。一旦在肿瘤相关间质中定居下来，成肌纤维细胞可能在多个方面使附近的上皮癌细

胞受益，其中血管生成可能最为重要。成肌纤维细胞通过释放间质衍生因子1（stroma-derived factor-1，SDF-1，也称CXCL12）帮助肿瘤形成，该趋化因子招募循环中的内皮前体细胞（EPC）进入肿瘤间质（图13.22）。成肌纤维细胞分泌的VEGF有助于诱导这些新成员分化为内皮细胞，形成肿瘤的新血管系统。由于血管生成在肿瘤发生过程中通常是一个限速步骤，混合CAF的促肿瘤作用可能很大程度上是由于它们能加速肿瘤血管生成。

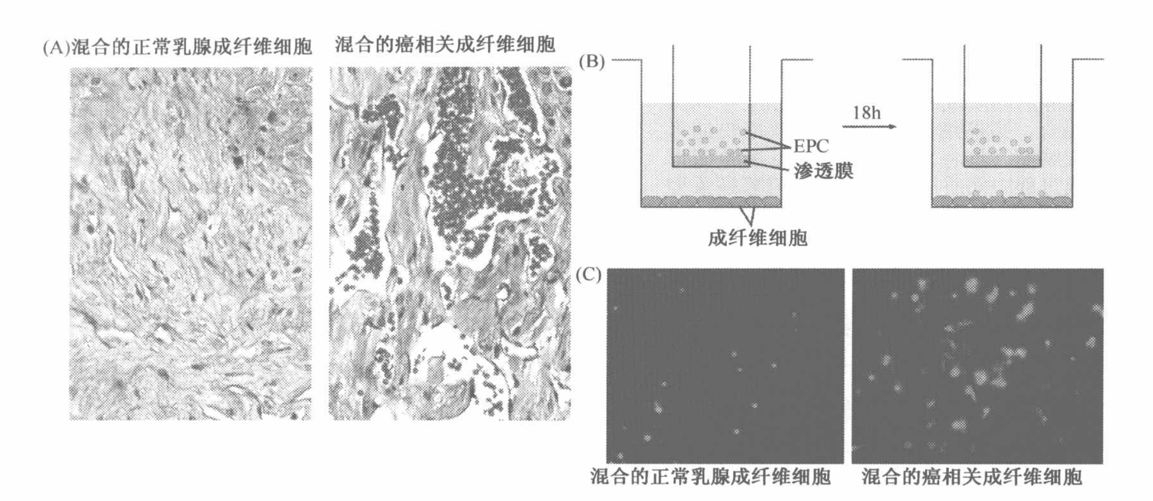


图13.22 乳腺CAF招募内皮前体细胞 （A）间质成纤维细胞和人MCF7-ras乳腺癌细胞系混合形成的肿瘤。当乳腺癌细胞与正常人乳腺间质成纤维细胞混合（左图），形成的肿瘤在肿瘤相关间质（蓝）中显示有相对较少的血管（红）。然而，与癌相关成纤维细胞（CAF，右图）混合，则形成伴有大量血管和红细胞（红）的高度血管化的肿瘤。（B）CAF（本质上是成肌纤维细胞）吸引内皮细胞的能力可通过一个体外实验证明。将用绿色荧光蛋白（GFP）标记的表达内皮前体细胞（EPC）特征性表面抗原的骨髓细胞，置于一个Boyden小室的渗透性膜的上面。正常乳腺间质成纤维细胞或来自乳腺癌细胞的CAF被置于下层小室底部的表面。18h后，用荧光显微镜计数被募集于下层小室底部的EPC的数量。（C）对吸附于下层小室的细胞进行分析显示，CAF（右图）可以比正常乳腺间质成纤维细胞（左图）吸引更多GFP标记的EPC。用抗血清中和小室中CAF释放的SDF-1/CXCL12细胞因子可使这种募集作用降低60%，显示该分子在介导这种募集中起重要作用。（From A. Orimo，P. B. Gupta，D. C. Sgroi et al.，Cell 121：1-14，2005.）

在一些肿瘤中，可能有其他机制导致间质功能的转变：在晚期癌中，间质细胞已与上皮癌细胞共存多年，可改变它们的基因型并获得正常间质细胞无法获得的遗传学特性，这提示在肿瘤形成的漫长过程中，间质细胞通过改变其基因组，与其相邻的肿瘤共同演化，以适应肿瘤内的生理环境带来的生存压力。

例如，对大量人乳腺癌中抑癌基因*PTEN*和*TP53*的突变分析显示，从肿瘤分离的间质细胞中存在突变的*PTEN*和*TP53*等位基因。这些实验使用激光显微切割（laser capture microdissection，LCM；图13.23）的方法从肿瘤中分离小块上皮或间质细胞。在一些肿瘤的上皮和间质中发现了不同的*TP53*等位基因突变。在另一些肿瘤中，突变的等位基因只存在于一个细胞群体，而另一个群体中则没有。这些实验说明上皮肿瘤细胞的遗传学演化（第11章）可能经常伴随有邻近间质细胞的基因组改变。

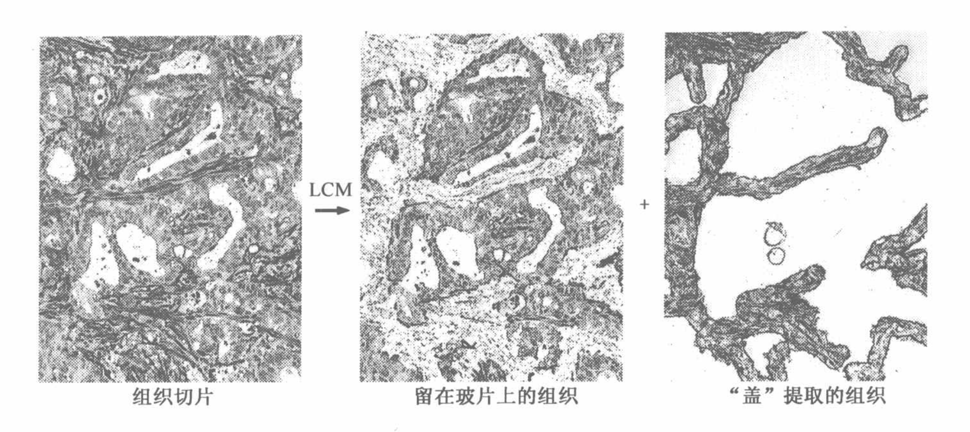


图 13.23　激光显微切割　激光显微切割（LCM）程序可让研究者用激光束来显微切割固定于载玻片上的组织切片。作为LCM操作的一个部分，一个称为“盖”的透明材料，被放置在一张黏附有组织切片的载玻片上。一个电力驱动的激光束照射所选区域，使这一区域的细胞黏附于“盖”上；将“盖”提起后，其上黏附的细胞可被用于生化分析。如图所示，左图显示了一张人结肠癌的切片，含有上皮区（淡蓝色）和间质区（棕色）。在这个例子中，显微切割操作将上皮区留在载玻片上（中间图），而间质区被挖出（右图）。被分离的两个细胞群可被用于各种进行分析，包括基因表达谱分析。（Courtesy of H. Dolznig.）

13.5　巨噬细胞是活化的肿瘤相关间质中的重要成分

肿块大量募集巨噬细胞似乎对肿瘤形成不利，因为巨噬细胞通常由免疫系统产生，清除并破坏感染性的物质及异常细胞，对此我们将在第15章详细探讨。但是越来越多的证据显示，这些免疫细胞在促进肿瘤发展中也起重要作用。

具体地说，骨髓中髓系单核细胞进入大循环，它们被癌细胞募集进入肿瘤：一旦安置下来，单核细胞即被诱导分化为巨噬细胞（见图13.14）。这种募集依赖于**趋化**因子传递的趋化信号。确切地说，这些因子为运动的细胞提供定向信号而不是促进其有丝分裂。对白细胞（如单核细胞）起到这种趋化作用的分子通常被称为**趋化因子**（chemokine），即趋化性的细胞因子。

多种类型的神经外胚层细胞和上皮性癌细胞都大量分泌一种被称为单核细胞趋化蛋白-1（有时称为巨噬细胞趋化蛋白MCP-1）的趋化因子。这种因子是吸引单核细胞到达一些肿瘤并诱导它们分化为巨噬细胞的关键信号。在其他肿瘤中，血管内皮细胞生长因子（VEGF）、集落刺激因子-1（CSF-1；通常称为巨噬细胞集落刺激因子，M-CSF），以及肿瘤细胞释放的PDGF，似乎也有助于这种募集，而且CSF-1有助于刺激单核细胞分化为巨噬细胞（图13.24）。

一旦定居于肿瘤间质中，巨噬细胞即在刺激血管生成中起重要作用。因此在一些癌，如乳腺癌中，产生MCP-1的水平、巨噬细胞的数量与各种肿瘤诱导血管生成的水平直接相关。在其他肿瘤中，浸润的肿瘤相关巨噬细胞的密度与微血管密度相关（图13.25A、B和C；其密度可通过测量一个肿瘤切片中每个显微视野中浸润的毛细血管数

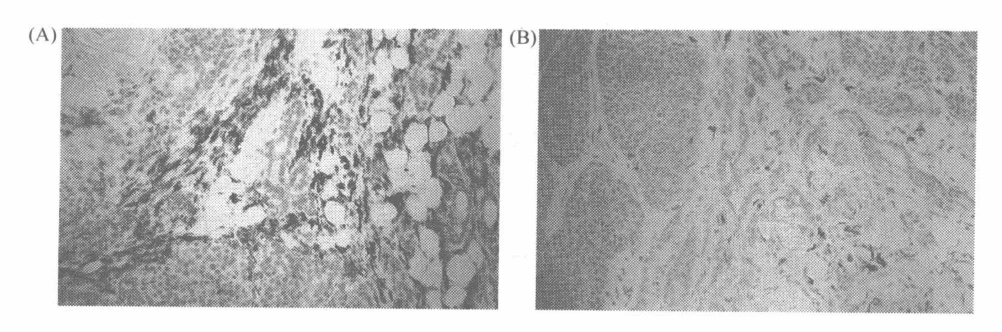


图 13.24 CSF-1 招募巨噬细胞 在一些肿瘤中，肿瘤细胞释放的集落刺激因子-1（CSF-1）是吸引单核细胞和巨噬细胞的关键因子。在转基因小鼠中转入 MMTV（小鼠乳腺肿瘤病毒）启动子，使得多瘤病毒（PyMT）癌基因过表达由此促进乳腺癌发生。（A）转基因的 PyMT 小鼠中产生的肿瘤，其 *Csf1* 位点是异质性的，因为它携带一个无效的编码 CSF-1 的等位基因，称为 $Csf1^{op}$。用检测巨噬细胞的单克隆抗体显示肿瘤间质中存在的巨噬细胞（红褐色）。（B）转基因小鼠中形成的肿瘤的基因型为 $Csf1^{op/op}$，完全丧失 *CSF-1* 活性。因此，该小鼠的肿瘤细胞不能释放这一化学吸引物。在这一乳腺肿瘤中，几乎检测不到巨噬细胞。缺乏巨噬细胞不影响原发瘤的生长，但强烈地抑制其演进至转移状态。（From E. Y. Lin, A. V. Nguyen, R. G. Russell et al., J. Exp. Med. 193:727-740, 2001.）

量而获得）。许多报告证明肿瘤块中高密度的巨噬细胞与携带这些肿瘤患者的不良预后直接相关，提示巨噬细胞在促进肿瘤演进中起主要作用。迄今，这种相关性已在神经胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌及肺癌中得到证实。

然而，这些仅是相关性的证据。用实验的方法促进肿瘤表达 MCP-1 可以更有力的证明巨噬细胞在肿瘤形成中起作用，至少在肿瘤血管生成中起作用。这一趋化因子的表达使得肿瘤细胞吸引更多巨噬细胞，后者继续分泌重要的血管生成因子，特别是 VEGF 和 IL-8，导致血管生成活性的显著增加，并形成更广泛的肿瘤相关血管系统。此外，当肺癌细胞在体外暴露于培养的巨噬细胞所分泌的各种因子中时，肿瘤细胞发生应答，并产生 IL-8 和许多其他促进血管生成及细胞侵袭的蛋白。

肿瘤中的乏氧区吸引着巨噬细胞，它们似乎能很好地耐受乏氧。一旦定居于肿瘤的乏氧区，这些炎性细胞开始分泌大量的 VEGF（图 13.25B 及 7.12 节），并通过内皮细胞、毛细血管和含氧丰富的血液给这一区域供氧，从而减轻乏氧的状况。事实上，肿瘤的乏氧区通常血管较少，仅凭募集的巨噬细胞并不能完全弥补局部血管生成的缺陷。因此在快速生长的肿瘤中，巨噬细胞及其诱导的血管系统不能与肿瘤的扩张速度保持一致，结果导致肿瘤块中大面积区域最终出现坏死（充满已死和将死的细胞）。

与成肌纤维细胞类似（13.3 节），巨噬细胞能够大量分泌基质金属蛋白酶（MMP，见表 1.3）。MMP-9 主要参与肿瘤演进，由肿瘤相关巨噬细胞产生（TAM；图 13.25D）。MMP-9 一旦被活化，继续裂解细胞外的蛋白底物。在某些侵袭性癌中，包括乳腺、膀胱和卵巢癌，TAM 已被证明是这些酶的主要来源。其通过以下方式促进肿瘤的演进：增强血管生成、破坏现有的组织结构为扩张的肿瘤开辟空间以及释放被 ECM 的蛋白多糖束缚固定不动的有丝分裂原。MMP-9 也可以裂解 IGFBP（胰岛素样

生长因子结合蛋白；信息栏 9.7)，后者通常在细胞外空间灭活 IFG 分子。这导致 IFG，特别是 IFG-1 的释放为邻近的细胞（包括肿瘤细胞）提供生存信号（图 13.26)。在晚期乳腺癌中，肿瘤相关巨噬细胞也能直接帮助癌细胞，因为它们是驱动表达 EGFR 的癌细胞增殖的上皮生长因子（EGF）的主要来源。

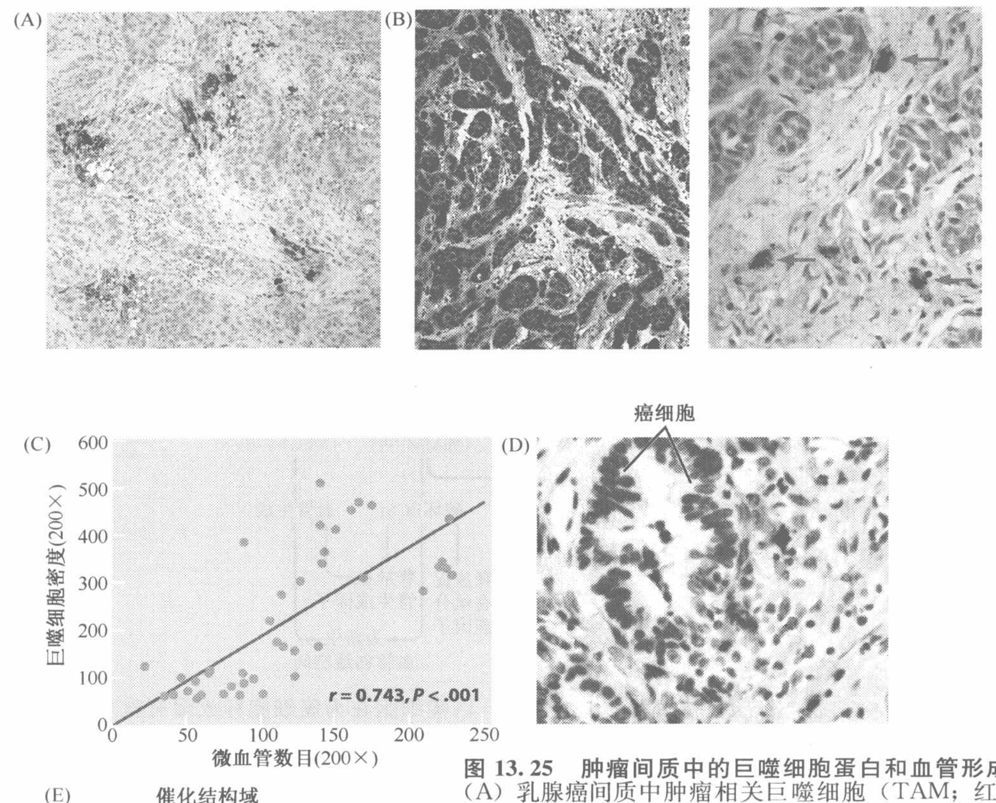


图 13.25　肿瘤间质中的巨噬细胞蛋白和血管形成（A）乳腺癌间质中肿瘤相关巨噬细胞（TAM；红色）的存在可通过用特异性识别表达于这些细胞的 HIF-2 蛋白的抗体来显示。与 HIF-1（见 7.12 节）相似，在乏氧细胞中 HIF-2 也参与血管生成蛋白的上调。（B）在特定的乳腺癌中（左图），肿瘤细胞合成潜在的血管生成因子 VEGF（血管内皮生长因子）；如图所示，癌巢用 VEGF 单克隆抗体染色显示为阳性（深色区域）。然而，在另一些乳腺癌中（右图），VEGF 产生于肿瘤相关间质中单个的巨噬细胞中（箭头）。（C）在一系列人非小细胞肺癌（NSCLC）标本中，每个标本由图中的一个点代表，以每个显微视野中 TAM 的密度对每个视野中的微血管密度（即毛细血管）作图。二者之间的相关性进一步证明 TAM 在促进肿瘤相关血管生成中起关键作用。（D）人结直肠腺癌间质中的巨噬细胞产生基质金属蛋白酶 9（MMP-9；棕色的点）是一个在血管生成和侵袭中起关键作用的酶。MMP-9 通过从细胞外基质释放血管生成因子促进血管生成。（E）MMP-9 以酶原的形式合成，通过被其他蛋白酶裂解而活化，导致前肽的释放（黄绿，右）。活性形式的 MMP-9 可以裂解细胞间隙各种不同的底物。使 MMP 得以命名的锌离子用黑色的球表示，钙离子显示为灰色的球。（A，from R. D. Leek and A. L. Harris，J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 7：177-189，2002；B，from R. D. Leek，N. C. Hunt et el.，J. Pathol. 190：430-436，2000；C，from J. J. W. Chen，Y. C. Lin，P. L. Yao et el.，J. Clin. Oncol. 22：953-964，2005；D，from B. S. Nielsen，S. Timshel，L. Kjeldsen et al. Int. J. Cancer 65：57-62，1996；E，from P. A. Elkins，Y. S. Ho，W. W. Smith et al.，Acta Crystal. Series D 58：1182-1192，2002.）

大量证据提示，一些巨噬细胞参与肿瘤演进，另一些不同形态的巨噬细胞亚系辅助免疫系统，可以发现并杀死癌细胞。很明显的是，它们在许多类型的肿瘤中都没有起到免疫作用。可能是一些肿瘤细胞获得了减弱第二类巨噬细胞的**肿瘤杀伤**能力，帮助肿瘤演进的第一类巨噬细胞仍然保留着完整的功能。或者，肿瘤细胞具有某种逃避机制，使其不被巨噬细胞识别。我们将在 15 章讨论巨噬细胞及其他类型的免疫细胞在阻止肿瘤发展中的作用。

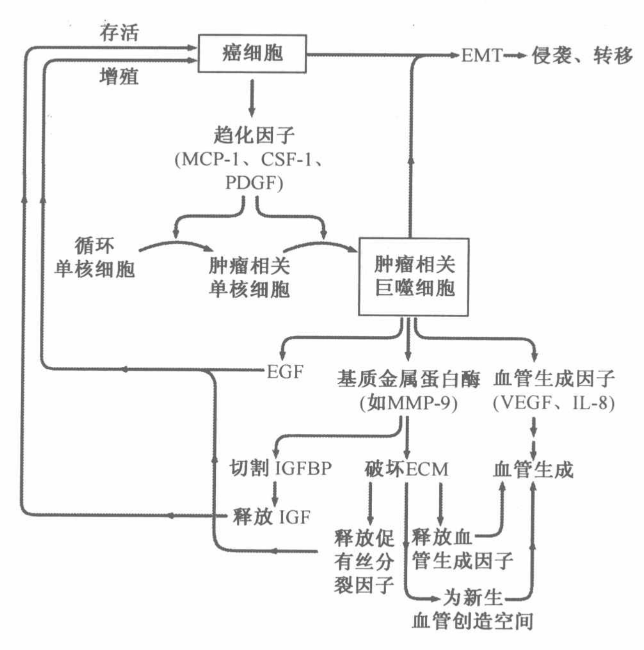


图 13.26　巨噬细胞在肿瘤发生中的作用　巨噬细胞在为癌细胞释放促有丝分裂原、识别肿瘤间质以促进血管形成，并且一些肿瘤细胞的侵袭中起主要作用。

13.6　内皮细胞及其形成的血管确保肿瘤得以接近循环系统

本章已反复引证肿瘤明显需要间质提供支持：与正常组织相似，肿瘤需要接近循环系统才能生长和生存。早在 50 年代中期，病理学家即注意到肿瘤优先生长在血管周围。人们发现距离血管 0.2mm 之外的肿瘤细胞不再生长，而更远处的肿瘤则会死亡（图 13.27 A)。

我们已经认识到存在一个阈值代表氧气可通过活组织有效扩散的距离。在距离血管大约0.2mm的这一半径范围内的细胞可依赖扩散保证它们的供氧；那些在这个距离之外的细胞则要经受中度或严重的缺氧（图 13.27B 和 C)。缺氧的组织有坏死的危险，如在图 13.27 和图 13.28 中说明的一样，p53 触发的凋亡也威胁乏氧细胞（第 9 章)，p53 信号系统失活可以使肿瘤在小幅度阈值之外得以存活。

乏氧不是细胞远离循环系统所付出的唯一代价。除获取氧气之外，细胞还需要与血管系统进行有效的相互作用以获取营养，并排泄代谢废物和二氧化碳。毛细血管网络在正常组织间穿行，密集分布。实际上组织中所有细胞与最近的毛细血管的距离都不超过

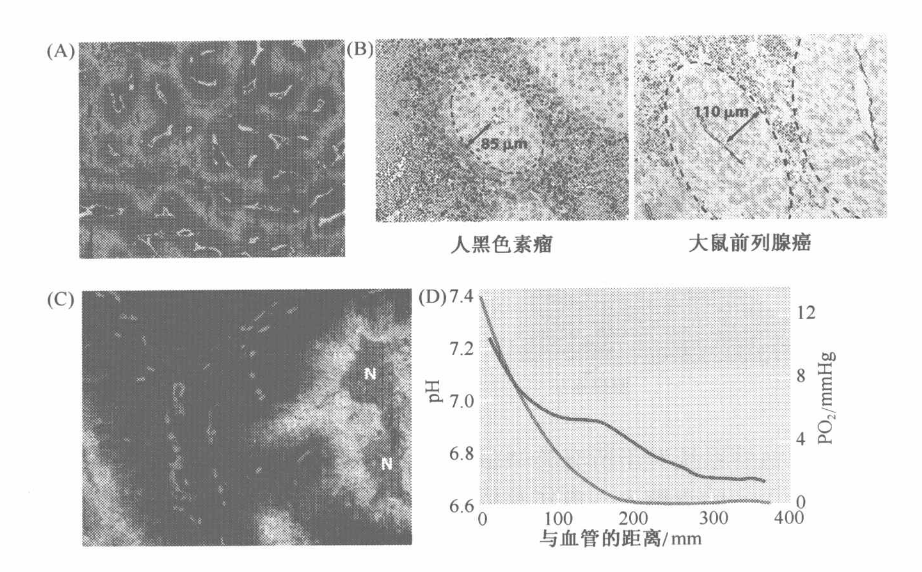


图 13.27 在缺乏血管的组织中细胞的乏氧和坏死 各种技术被用来证明毛细血管周围组织区的乏氧和坏死。(A)这张显微图像揭示毛细血管(绿)及肿瘤实质周围的氧化程度。用抗 EF5(一个定位于组织乏氧区的分子)抗体进行免疫染色，显示距毛细血管一定距离之外的区域是乏氧的(红)，而供氧良好的细胞未被染色而呈现深褐色。(B)用抗 CD31 抗体对人黑色素瘤(左)和大鼠前列腺癌(右)的切片进行免疫染色显示毛细血管。紧邻毛细血管的是明显的健康细胞的区域。然而，超过每根毛细血管周围虚线的边界，是明显的坏死区(颗粒状的区域)。坏死区开始于距黑色素瘤毛细血管 85μm 处，距前列腺癌毛细血管 110μm 处。这种坏死揭示了扩散在肿瘤实质中氧气和营养物质从毛细血管运输至细胞的过程中的局限性。(C)此例人头颈鳞癌中，有大量供氧良好的肿瘤细胞，血管(蓝点)可以为这些肿瘤细胞供氧(呈现黑色)。然而，在血管较少和中度乏氧的区域表达碳酸酐酶(红)；而在极度乏氧的区域可检测到哌莫硝(pimonidazole，组织乏氧的标记)染色(绿)。这两种标记重叠呈现橘色。距肿瘤血管系统更远部位的坏死区域，用“N”表示。(D)使用指示剂染料及活体(intra-vital)荧光显微镜技术使得测量距血管不同距离处的微环境中的 pH 和 P_{O_2}(局部氧分压)成为可能。这些测量解释了血管较少区域中坏死的根本原因：距血管 0.2mm 以外区域的氧压降至零，而 pH 降至与正常细胞代谢不相容的水平，主要是厌氧条件下出现的乳酸产物的结果。(A，courtesy of B. M. Fenton；B，left，courtesy of N. Almog and M. J. Folkman；B，right，from L. Hltaky，P. Hahnfeldt and J. Folkman J. Natl. Cancer Inst. 94：883-893，2002；C，from J. H. Kaanders，K. J. Wijffels，H. A. Marres et al.，Cancer Res. 62：7066-7074，2002；D，from G. Helmlinger，F. Yuan，M. Dellian and R. K. Jain，Nat. Med. 3：177-182，1997.)

几个细胞的直径。因为代谢速率高，特定的组织生长出密度非常高的毛细血管，以确保几乎每个细胞都可与内皮细胞及它们形成的毛细血管直接接触。实际上，肝中每个肝实质细胞邻近一个称为窦状隙的空间，它与内皮细胞相连作为一个毛细血管。用抗 laminin 抗体进行免疫染色，显示每根肌纤维都是一个单个的合胞体细胞，由数个成肌细胞融合形成。每根肌纤维邻近一根或更多的毛细血管。在一些正常组织，尤其是具有高代谢活性的组织，多数细胞都能够与至少一根毛细血管直接接触。这种密切的联系意味着它们可以直接从血管中得到所需的氧气和必需的营养物质，而不必穿过层层紧密堆积的细胞。

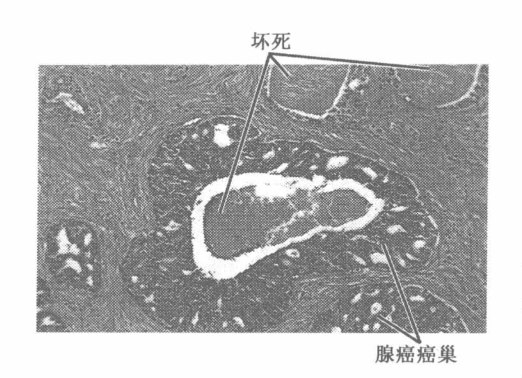


图 13.28　肿瘤中的大规模坏死　通过这个晚期前列腺腺癌证明肿瘤中大部分细胞无法接近间质中的血管系统。如图所示，十分清楚，在中心生长的是腺癌癌巢（深红）被大量的间质包围（浅红）。在癌巢的中央是一大块坏死的组织（浅红），已皱缩并脱离了围绕它的有活力的腺癌细胞。后者生长旺盛，因为它们能更好地接近间质和相关的血管系统。（From A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003.）

这些观察说明血管系统对于所有类型组织（正常及肿瘤组织）的生长和存活具有重要意义。在胚胎发生、胎盘植入、愈伤及特定的病理条件，如糖尿病性视网膜病、牛皮癣、风湿性关节炎，以及肿瘤发生过程中均可观察到。

胚胎发育过程中，一个器官及组织的结构或大小是由遗传编程的，但是单个组成细胞的精确定位并非如此，这同样适用于血管系统。基因组决定主要血管的总体布局并将设计和装配局部毛细血管网和稍大血管的任务委派给组织内的单个细胞。短距离的异型相互作用决定着构建微血管系统的单个毛细血管的走向。更加特别的是，组织中的毛细血管似乎可在任何需要它们的无血管（即实质的）的细胞处形成。肿瘤发生过程与之相似。一个生物体的基因组不能决定肿瘤的总体构造，因为每个肿瘤都是新创造的，而不是由基因组预先设计的，这暗示肿瘤血管生成也是如此。肿瘤不能依照遗传信息配置它们的血液供给系统，而是必须根据肿瘤发展的不同阶段，调整血管系统的布局。特别是在组装它们自己的供血系统时，肿瘤完全依赖瘤内无血管的细胞（包括肿瘤细胞和其他类型的起支持作用的间质细胞）与血管系统的细胞（包括内皮细胞、外膜细胞和平滑肌细胞）间局部的异型相互作用。

我们已经知道肿瘤以两种方式装配血管系统。肿瘤相关间质中的成肌纤维细胞可释放趋化信号，如 SDF-1/CXCL12，帮助募集循环内皮前体细胞进入间质（图 13.22）。这种募集可能是由 VEGF 的释放辅助完成的，VEGF 也可帮助这些细胞成熟为有功能的内皮细胞。

正如我们在 7.12 节首次描述的一样，VEGF 的产生是由可利用的氧气控制的。因此，许多类型的细胞通过 VHL 蛋白与其伴侣分子的作用，利用它们自身细胞间储备的氧压。在乏氧条件下，这个蛋白复合物允许功能性的 HIF-1 转录因子聚集，转录因子反过来驱动大量基因表达，这些基因的表达产物可以促进血管生成。其中最关键的血管生成因子 VEGF 的产生依赖于肿瘤的类型及其演进的阶段，与肿瘤细胞、巨噬细胞和成肌纤维细胞有关（事实上，有两种结构相关、功能相似的蛋白，称为 VEGF-A 和 VEGF-B。这里我们将继续用通用术语 VEGF 来表示它们两种）。

与许多其他生长因子类似，VEGF 是酪氨酸激酶受体的配体。在这里，其酪氨酸激酶受体指 VEGF 受体 1（也称 Flt-1）及 VEGF 受体 2（也称 Flk-1/FDR）。它们都表达于内皮细胞的表面。相似地，另一个重要的血管生成因子，碱性的成纤维细胞生长因子（bFGF），与内皮细胞表达的同源受体结合。一旦受到这些血管生成因子的刺激，

内皮细胞增殖并扭曲它们的胞质形成毛细血管圆柱状的细胞壁（图 13.29）。这些毛细血管可以穿透现存的组织层，向局部血管生成因子浓度最高的部位移动。

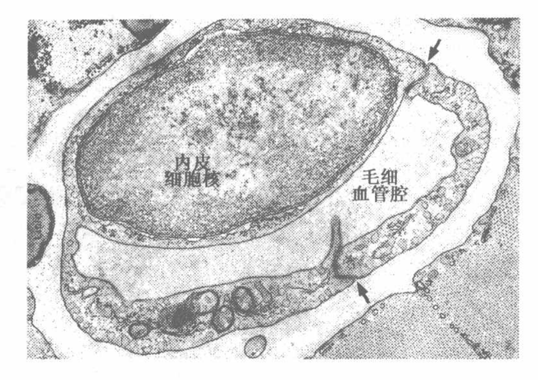


图 13.29　内皮细胞和毛细血管的形成　这张透射电镜显微照片显示心肌中一根毛细血管的横截面，并且显示了两个相互连接的内皮细胞（箭头）的胞质形成毛细血管的腔。相邻内皮细胞的质膜紧密封闭形成毛细血管，其细胞壁是连续的并且通常没有缝隙。这里可见其中一个内皮细胞的核。(From D. W. Fawcett，J. Histochem. Cytochem. 13：75-91，1965.)

相似的机制在淋巴管形成时似乎也起作用（信息栏 13.5）。正如我们在本章后面将看到的，淋巴管在肿瘤间质中是体液平衡的重要调节者。在下一章里，它们被认为极具重要性，因为它们为癌细胞提供了从原发部位逃逸和散布到机体远处的途径。

信息栏 13.5　内皮细胞也可构成淋巴管　淋巴管在正常生理学中有两个主要功能。它们从细胞的空隙排除液体并将它们导入静脉循环。此外，它们允许免疫系统的抗原呈递细胞从各种组织运输抗原至淋巴结，免疫反应通常在那里启动（第 15 章）。

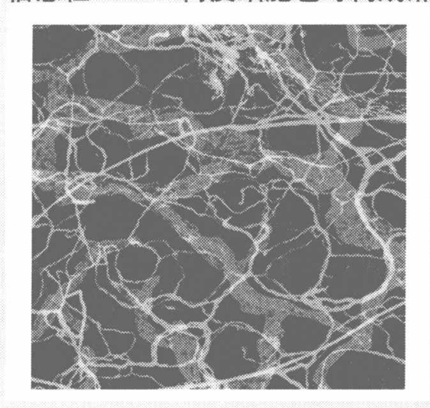


图 13.30　淋巴管和毛细血管网　多数正常组织由毛细血管（绿）和淋巴管（棒状橘色）交织成网络。很明显的是，淋巴管的直径远远大于毛细血管。与毛细血管不同，淋巴管的内皮细胞不是由其下面的壁细胞——外膜细胞和平滑肌细胞所支撑的。(Courtesy of T. Tammela and K. Alitalo.)

有趣的是，淋巴管由内皮细胞组装形成，这些内皮细胞与形成毛细血管和大血管的内皮细胞来源于相同的胚胎干细胞群体。在胚胎发育过程中，可以观察到淋巴管最初萌芽于发育中的毛细血管（图 13.30），然后才与毛细血管分离，并形成自己独立的网络。此外，刺激淋巴管形成的因子——血管内皮细胞生长因子 C 和 D（VEGF-C 和 VEGF-D），与在刺激产生血管的血管生成作用中起主要作用的 VEGF-A 及 VEGF-B 是同源的。

如人们所预期的，淋巴内皮细胞表达 VEGF-C 和 VEGF-D 的受体——VEGF 受体 3（VEGF-R3）在结构上与主要的毛细血管 VEGF 受体 VEGF-R2 是相似的。此外，有清楚的证据表明，主要负责驱动淋巴管形成的 VEGF-D，也可能通过结合并活化 VEGF-R2 刺激血管形成。因此，这两个系统——血管和淋巴网络有共同的进化起源，从胚胎中共同的前体发展而来，并在成体组织中以复杂的方式继续相互作用。

将小块肿瘤移植至实验动物如兔子的角膜或耳中，首次发现血管生成因子的存在。几天之内，以前存在的毛细血管床中形成密集的毛细血管网和较大的血管，这些毛细血管网及血管进而汇聚于移植的肿瘤块中。这些现象（图 13.31A）使我们直观地认识了肿瘤及其血管系统的关系，它们生动地说明肿瘤具有较强的募集血管的能力。

实际上，毛细血管的形成远比以上描述的血管生成复杂得多。一方面，除在吸引

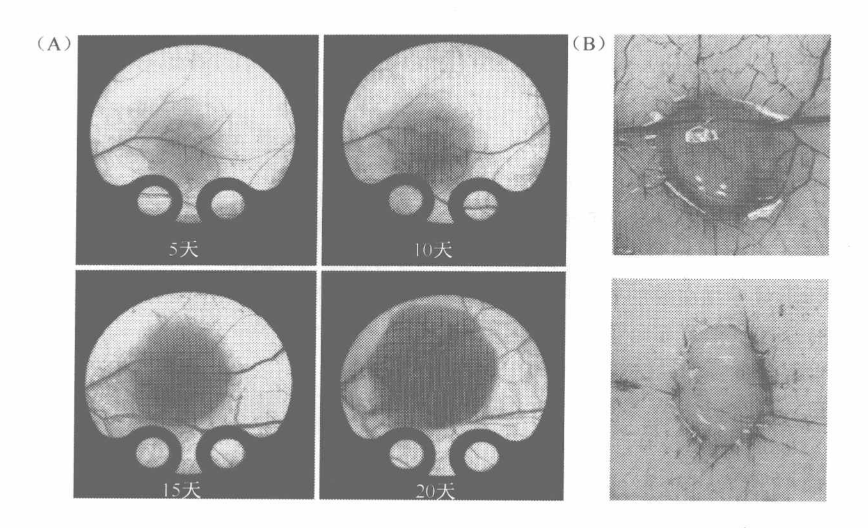


图 13.31 移植瘤募集的毛细血管 (A) 这些图像显示一小群皮下移植超过 20 天的人结直肠腺癌细胞的生长。肿瘤相关血管的生长可通过插在小鼠皮肤肿瘤之上的一个窗子观察到。(B) 在携带人腺癌细胞的小鼠的异种移植物中，这种血管形成过程可被 VEGF 受体的拮抗剂所抑制。这里显示的是 VEGF 受体的一个抑制剂 ZD6474 的作用。在未处理的对照小鼠中，广泛的粉色背景是大量毛细血管的象征，进入肿瘤块的主血管（上）的数量在药物（下）存在时明显降低。(A, from M. Leunig, F. Yuan, M. D. Menger et al., Cancer Res. 52: 6553-6560, 1992; B, from S. R. Wedge, D. J. Ogilvie, M. Dukes et al., Cancer Res. 62: 4645-4655, 2002.)

血管至肿瘤中起主要作用的 VEGF 外，这个复杂的形态发生过程还涉及许多其他因子（图 13.31B），包括多种形式的 TGF-β、碱性成纤维生长因子（bFGF）、白细胞介素 8（IL-8）、angiopoietin（促血管生成素）、angiogenin（血管生长素）和 PDGF。而且，除内皮细胞外，一些不同类型的细胞也有助于毛细血管和大血管的形成。正如所提到的，内皮细胞形成毛细血管的内腔，它们又被腔壁的外膜细胞和血管平滑肌细胞进一步包围（图 13.6）。

在正常组织中可见毛细血管被外膜细胞规则地覆盖（图 13.6B），与之形成反差的是外膜细胞在肿瘤相关毛细血管附近的杂乱分布（图 13.32）。肿瘤中典型的毛细血管的直径是正常的 3 倍。此外，肿瘤内部及肿瘤周围血管的整体布局相当混乱（图 13.33）。通常血管突然停止于袋状的盲端或盘旋回来附着于自身。在亚显微水平，肿瘤块中的毛细血管很显然是随意组装的。因为相邻内皮细胞的质膜并没有相互接触形成围绕毛细血管腔的无缝隙的内层，相反经常保留着几微米宽的缺口（图 13.34），导致血浆直接流到毛细血管周围的细胞，由此导致的渗漏解释了为何肿瘤实质中有纤维蛋白的沉积。

定量测量显示肿瘤中毛细血管壁的通透性比正常毛细血管高 10 倍。有些渗漏可能是由于此处提及的毛细血管壁组装缺陷。但是，仅此一点并不足以解释所有渗漏。相反，多数渗漏似乎是由于肿瘤中 VEGF 的生成失调所致（信息栏 13.6）。

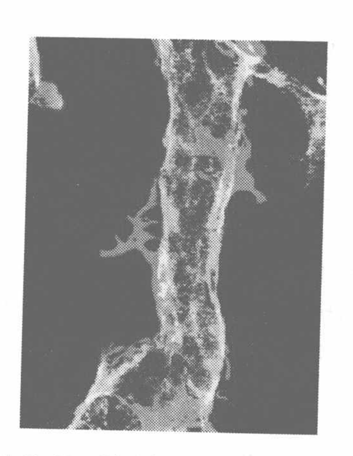
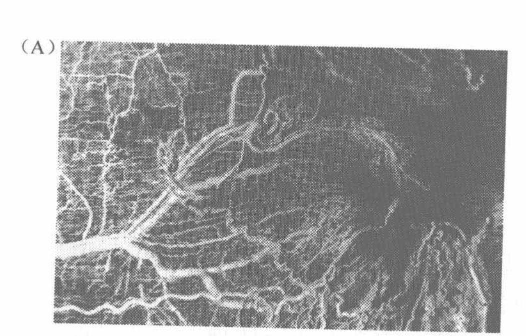
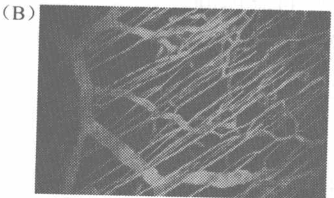


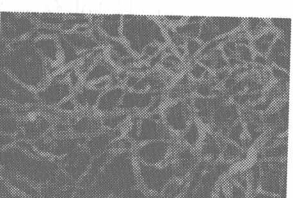
图 13.32　肿瘤相关外膜细胞　这张荧光显微照片显示肿瘤相关微血管的结构，这是小鼠 Lewis 肺癌（LLC）细胞中形成的一根血管。内皮细胞形成的血管内腔（绿）仅有部分被外膜细胞和平滑肌细胞覆盖（橘红）。外膜细胞松散地附着于毛细血管，与图 13.6B 中所见的二者紧密附着形成反差。(From S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh et al., Am. J. Pathol. 160：985-1000，2002.)

(A)



(B)





正常组织　　肿瘤

图 13.33　肿瘤相关血管系统组织混乱　(A) 这张图像是通过在组织固定前向血管内注射一种树脂获得的，显示供养肿瘤细胞块（黑色区域，最右侧）的血管系统是曲折而无序的，与正常组织中有序的血管系统（松绿色，上左）形成反差。(B) 活组织成像（活体内成像）技术使正常和肿瘤组织的毛细血管床的可视化成为可能。这一技术揭示正常组织中的毛细血管网是高度有序的（左），而肿瘤组织中的毛细血管网是杂乱无章的。(A, courtesy of L. Heiser and R. Ackland, University of Louisville; B, from R. K. Jain, Nat. Med. 9：685-693，2003.)

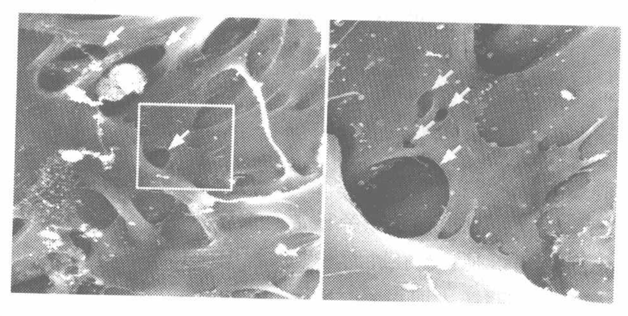


图 13.34　肿瘤血管系统中缺口的扫描电镜图　这些扫描电镜显微照片显示内皮细胞层，环绕正常毛细血管壁形成连续的、不间断的表面（未显示），但在肿瘤中的毛细血管并非如此。相反，肿瘤相关内皮细胞相互交叠，如图所示（箭头）它们之间有相当大的缺口。右图为左图中方框的高倍放大图。这样的缺口允许血浆渗出至癌细胞间的腔隙，造成这些腔隙中高的流体静压。(From H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa et al., Am. J. Pathol. 156：1363-1380，2000.)

信息栏 13.6　血管内皮生长因子（VEGF）引起毛细血管的渗漏　VEGF-A 编码基因最初由两个独立的研究分别克隆。一个研究项目鉴定了由癌细胞分泌的、导致血管渗漏液体的一种因子，其因此被称为血管渗透性因子（VPF）。另一项工作集中于肿瘤释放的一个因子，其功能是组装毛细血管管腔壁的内皮细胞的吸引物和有丝分裂原，这一物质被称为血管内皮生长因子（VEGF），这个名字被沿用至今。这两项研究的成就在 1989 年到达顶峰，VPF-和 VEGF-编码基因分别被确定，并发现它们的编码基因相同。肿瘤相关间质中的癌细胞、巨噬细胞以及成肌纤维细胞持续释放大量的 VEGF，导致大部分肿瘤相关毛细血管和小静脉渗透性的升高。VEGF 诱导渗透的确切机制仍不清楚。VEGF 可能引起相邻内皮细胞质膜轻微地分离，使它们之间产生缝隙。此外，它可能刺激内皮细胞通过它们的胞质从腔内向腔外运输液体和溶质。

肿瘤中毛细血管和较大的血管建造得如此杂乱的确切原因还不清楚。一个可能的因素是两种相互拮抗的生长因子，即促血管生成素-1 和-2 之间的平衡被破坏。VEGF 通过吸引和刺激内皮细胞启动毛细血管生长，而促血管生成素-1 和-2 的混合物诱导内皮细胞募集外膜细胞和平滑肌细胞，使得新形成的毛细血管成熟为含有适当比例的三种细胞类型的，构造良好的血管。这两种拮抗的促血管生成素的不平衡，与肿瘤内过高水平的 VEGF 均可能是大多数肿瘤中毛细血管及较大血管构造混乱的原因。

肿瘤相关毛细血管的渗漏导致肿瘤实质间隙中大量体液的累积。在正常组织中，这些体液可由淋巴管引流最终进入静脉循环（信息栏 13.5）。然而，在实体瘤中，癌细胞群的扩张使淋巴管外部压力增大，这种压力使仅存的淋巴管坍塌（图 13.35）（毛细血管对这种压力有较强的抵抗能力，因为它们自身内部有非常大的流体静压，这是淋巴管所没有的）。在实体瘤核心区域中，由此导致的淋巴排泄系统障碍进一步加剧了由毛细血管渗漏造成的体液积累，在肿瘤的无血管部分产生相对较高的液压。这种压力不利于抗肿瘤药物的渗入（补充材料 26 ◎）。

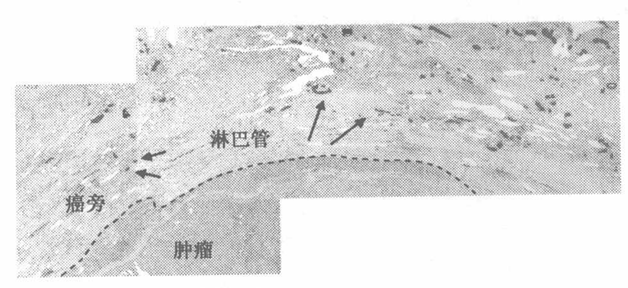


图 13.35　实体肿瘤中缺乏淋巴管　在肝细胞癌中，用淋巴管特异性抗体对淋巴管进行染色（红色）发现，淋巴管只出现在癌旁正常组织中（虚线表示肿瘤边缘），而在肿瘤块中缺乏淋巴管。原因可能是：①在肿瘤发生过程中没有生成淋巴管；②淋巴管因无法耐受实体肿瘤中较强的流体压力而塌陷。（From C. Mouta Carreira，S. M. Nasser，E. di Tomaso et al.，Cancer Res. 61：8079-8084，2001.）

13.7　血管生成开关的开放对肿瘤扩张是必需的

前面对血管生成的描述，以及前面一些章节的内容（见 7.12 节），似乎提示血管生成因子的释放实际上是自动的：包括肿瘤细胞在内的细胞群体，无论什么时候经受乏

氧，它们都释放血管生成因子，由此驱动毛细血管进入它们中间。这减轻了乏氧，并在存有这些细胞的组织中产生适当密度的毛细血管。

事实上，吸引血管的能力是许多肿瘤细胞群体最初所缺乏的，但这一能力在肿瘤演进过程中是必不可少的。在特定的肿瘤中，毛细血管附近的肿瘤细胞能够旺盛生长，但距离毛细血管 0.2mm 之外的癌细胞停止生长并可能发生凋亡或坏死（13.6 节）。因此，即使这些癌细胞遭受乏氧，也缺乏诱导附近毛细血管生成的能力。

通过实验模型的详细研究，我们了解了肿瘤发生的许多机制，其中提供信息最多的是 Rip-Tag 转基因小鼠实验。该小鼠携带一个胚系转基因——胰岛素基因启动子驱动 SV40 大 T 抗原（8.5 节及 9.1 节）和小 T 抗原（补充材料 18 ◎）的表达。该启动子确保病毒癌蛋白在胰腺中形成胰岛的 β 细胞中表达（胰岛素通常在这里产生）。

在约 400 个小鼠胰岛中肿瘤的演进可以很容易地被观察，因为这些胰岛与周围参与制造和分泌消化酶的**胰腺**组织很容易区分。10 周龄时，约有一半 Rip-Tag 小鼠形成增生结节，其中 8%～12%增生的胰岛最终获得了募集新血管进入它们之中的能力。至 12～14 周时，最初形成的增生性胰岛中约 3%最终演进成为癌（图 13.36）。

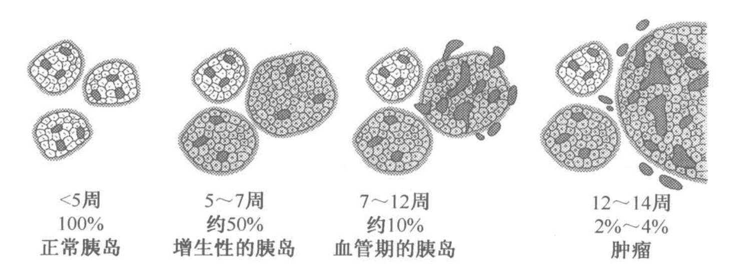


图 13.36 Rip-Tag 模型的胰岛细胞肿瘤演进模型 Rip-Tag 转基因小鼠模型的多步肿瘤发生过程的不同阶段。一个正常的胰岛（或称郎格罕氏岛，左）含有少量毛细血管以供养 13 个细胞。5～7 周龄时，大约一半的胰岛变成增生性的，但是血管密度并不增加。在此后的 7～12 周，大约 10%增生的胰岛成为血管期的。如图所示，在其周围，胰腺外分泌腺的附近，毛细血管的密度极大的增加。最终，至 12～14 周时，最初形成的增生性的胰岛有 2%～4%成为侵袭性的癌，快速生长并侵袭至周围的胰腺外分泌腺。包围着胰岛的胰腺外分泌腺在这里没有显示。（From D. Hanahan and J. Folkman，Cell 86：353-364，1996.）

在 Rip-Tag 小鼠肿瘤演进的早期，增生的胰岛开始轻微扩张至直径为 0.1～0.2mm，并暂时停止了它们的继续发展（图 13.36）。在这些小的肿瘤细胞巢，细胞被转入的致癌基因驱动持续不停地分裂。然而，每个胰岛中肿瘤细胞群体的总体积保持恒定，因为不断有细胞发生凋亡而损失掉。这个小鼠模型提示，人类中小肿瘤细胞巢在很多年里保持这种不断分裂但体积不变的状态，无法突破限制它们的屏障。

通常，肿瘤细胞巢扩张的屏障可能是物理性的——在组织中缺乏足够的空间让它们繁殖。但是对这些小的癌巢进行详细的组织学分析结果却并非如此，因为这些细胞还没有开始形成血管，它们缺乏血管系统。由此导致的乏氧触发 p53 依赖的凋亡，这可以解释它们较高的死亡率（可能是在这些血管较少的细胞巢中其他不利的条件，包括养料供应的不足，高水平的 CO_2 和代谢废物，乳酸积累引起的低 pH，都可导致这些细胞的死

亡）。

然而在某些时间点上，一小群癌前胰岛细胞突然获得了引发新血管生成的能力（图13.36）。一旦这些细胞能够在其周围诱导形成毛细血管，限制它们及其后代增殖的因素将被解除。这种小肿瘤块行为上的显著改变，被称为**“血管生成开关”**。

根据这些现象推测：机体自发地压制血管生成。这是机体阻止肿瘤生长的另一种方式。根据这一推论，血管生成开关无疑是肿瘤演进中的一个重要步骤，代表癌细胞成功突破了这一防御屏障并且获得任意诱导血管生长的能力。

有人可能会得出结论，在这些转基因小鼠中，恶化前的β细胞突然获得的释放VEGF的能力驱动了血管生成开关。事实上，与完全正常的胰岛一样，这些细胞在血管生成开关出现之前很久就已制造了大量的VEGF。然而，这些由β细胞分泌的VEGF分子可被周围的细胞外基质（ECM）有效地隔离，因此VEGF分子不能刺激血管生成。

VEGF的隔离状态解释了为什么在Rip-Tag胰岛中的血管生成开关伴随着突然出现的大量的基质金属蛋白酶9（MMP-9；13.5节）。MMP-9以靶向作用的方式裂解ECM的特定结构成分，从而释放VEGF，这时VEGF才能作为信号分子传递到附近的上皮细胞。MMP-9是由炎性细胞（肥大细胞，并且很可能是被吸引至恶变前的胰岛细胞的巨噬细胞）合成并释放的（信息栏13.7）。因此，在此特定的组织中，血管生成开关的开放从根本上依赖于招募炎性细胞的能力。

信息栏13.7　来自骨髓的肥大细胞在血管生成开关中起关键作用　携带胚系胰岛素-SV40转基因的Rip-Tag小鼠，可与其他缺乏Kit生长因子受体（见信息栏5.7）的小鼠繁育。Kit作为干细胞因子（SCF）的受体是一个重要的生长因子，可触发特定亚系的造血前体细胞的生长。$Kit^{-/-}$小鼠的另一个缺陷是缺乏形成肥大细胞的能力。在缺乏Kit受体的Rip-Tag小鼠中，胰岛细胞瘤以在标准的Rip-Tag小鼠中观察到的常规速度启动。然而，这些肿瘤不能生成血管，并且这些小肿块中的细胞增殖速率与凋亡速率相等。因此，这些肿瘤保持在一个很小的尺度上（直径0.1～0.2mm）。

如果给这些小鼠提供含有野生型造血前体细胞的骨髓移植物，可以弥补其肥大细胞的缺陷，启动胰岛中的血管生成，胰岛中的肿瘤细胞不再通过凋亡丢失，随后致命的大肿瘤很快就出现了。这证明驱动血管生成的能力依赖于至少一种肿瘤相关间质的非内皮细胞成分的作用（肥大细胞来源于骨髓）。这些肥大细胞对血管生成开关的主要贡献似乎在于释放MMP-9，它可以继而释放VEGF并由此导致血管生成（图13.37）。

如果用基因工程技术选择性地使胰岛细胞中编码VEGF的基因缺失，胰岛存活并且肿瘤发生的早期步骤仍然可以正常地进行，但不会出现血管生成开关。这更加说明了胰岛细胞来源的VEGF分子在触发血管形成启动中起关键作用的结论，而且招募的间质细胞不能通过它们自身带来的VEGF补偿这种VEGF的缺乏。

上述过程（图13.37）涉及三种不同类型细胞之间的异质性相互作用：①从恶变前的胰岛细胞释放的仍未确定的信号，招募肥大细胞，很可能还有巨噬细胞；②这些炎性细胞释放的MMP-9活化恶变前胰岛制造的、之前潜伏着的VEGF；③内皮细胞对活化的VEGF发生反应而增殖。事实上，可能还有其他类型的细胞参与胰岛细胞的血管生成。因此，许多内皮细胞可能来自于募集的循环内皮细胞前体细胞（EPC，有时称为循

环内皮前体，或 CEP)；并且最终形成毛细血管，尽管是不规则地被另一种来源不明的外膜细胞所覆盖。

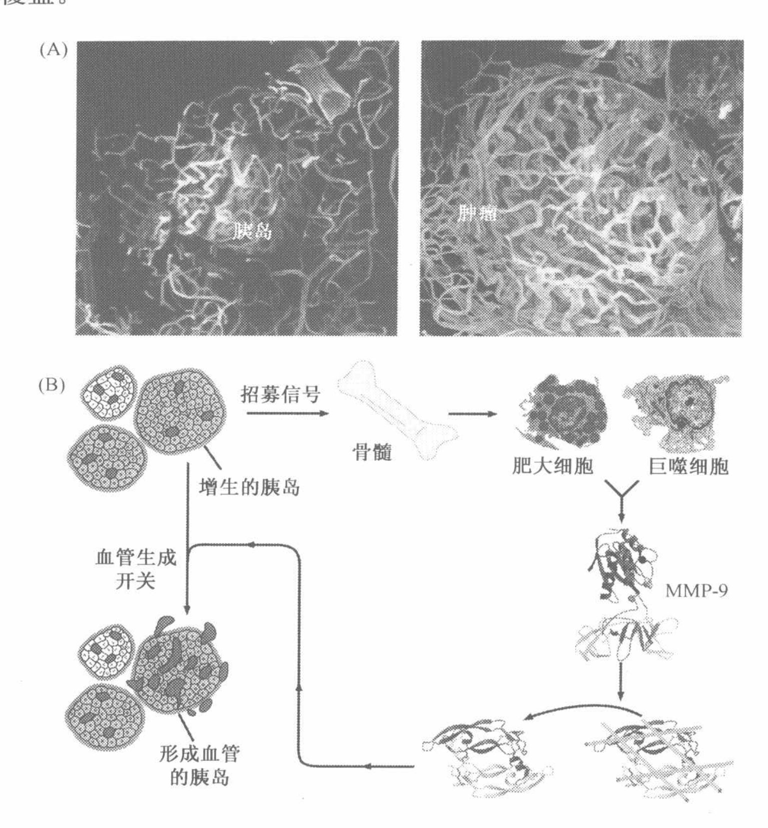


图 13.37　血管生成开关及炎性细胞的募集　(A) 正常胰岛（圆形区，左图中间）的血管较少并且其生存很大程度上是通过其周围微血管的扩散作用。血管生成开关开放后，胰岛中的细胞数量由于肿瘤扩张而增加，如图所示，显著地诱导血管生成（右图）。此图是通过对凝集素灌注的血管进行整体显微摄影获得的。(B) 根据这个示意图，一个血管期前的、增生的胰岛发送信号至骨髓和（或）循环系统（图中未标注），导致肥大细胞和巨噬细胞的招募。一旦接近胰岛，它们释放金属蛋白酶，特别是 MMP-9（见图 13.25E）。MMP-9 可以裂解细胞外基质成分，将 VEGF 从隔离状态释放出来。VEGF 继而在胰岛周围诱导形成血管，由此使血管生成开关开放。(A，from G. Bergers，D. Hanahan and L. M. Coussens，Int. J. Dev. Biol. 42：995-1002，1998；B，adapted from data in G. Bergers，R. Brekken，G. McMahon et al.，Nat. Cell Biol. 2：737-744，2000；VEGF：Y. A. Muller，B. Li，H. W. Christinger et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94：7192-7197，1997.)

重要的是，Rip-Tag 模型不能代表所有类型肿瘤形成过程中的血管形成机制。例如，在一些肿瘤中，血管形成似乎是日益增多的，好像一个受控制的可变电阻器，逐渐被打开，这与 Rip-Tag 胰岛的行为形成反差。在 Rip-Tag 胰岛中，血管形成好像是由一个二元转换开关所启动的。

其他肿瘤可能依赖不同的血管生成因子引发血管形成。例如，当转化的小鼠胚胎干细胞（ES）失去两个拷贝的 VEGF-A 编码基因，它们失去几乎全部的形成恶性畸胎瘤

的能力。相反，转化的成年小鼠皮肤成纤维细胞在失去两个拷贝的 VEGF-A 编码基因后仍保留高度的致瘤性，并且这些转化的成纤维细胞产生的肉瘤仍能继续生长，即使使用可结合并灭活 VEGF-R2（主要的内皮细胞受体，赋予对 VEGF-A 和 VEGF-B 的响应性）的抗体处理携带它们的小鼠。转化的皮肤成纤维细胞能产生一种复杂的血管形成因子复合物，包括 VEGF-B、酸性及碱性的成纤维生长因子（aFGF 及 bFGF），以及转化生长因子（TGF-α），这些可能对以上行为作出解释。这种动用多种血管形成因子的现象（见表 13.2）通常出现在晚期肿瘤中，由此增加了通过抗血管形成治疗肿瘤的难度，正如我们后面所见到的一样。

表 13.2　重要的血管生成因子

名　称	分子质量/kDa
血管内皮生长因子（VEGF）	40～45
碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）	18
酸性成纤维细胞生长因子（aFGF）	16.4
血管生长素（angiogenin）	14.1
转化生长因子-α（TGF-α）	5.5
转化生长因子-β（TGF-β）	25
肿瘤坏死因子-α（TNF-α）	17
血小板源生长因子（PDGF）	45
粒细胞集落刺激因子	17
胎盘生长因子	25
白细胞介素-8（IL-8）	40
干细胞生长因子（HGF）	92
增殖蛋白、多育曲菌素（Proliferin）	35
促血管生成素（Angiopoietin）	70
瘦素、瘦蛋白（Leptin）	16

13.8　血管生成开关启动一个高度复杂的过程

在肿瘤穿破基底膜之前血管生成起始于 Rip-Tag 肿瘤周围的间质，许多小鼠和人的肿瘤均如此（图 13.38）。由于某种原因，良性肿瘤细胞使血管生成信号快速通过多孔的基底膜（BM），以促进此膜基质侧的血管生成。通过基底膜传输的其他信号招募成肌纤维细胞到附近间质（图 13.39）。正如前面所提及，这些成肌纤维细胞也可促进血管生成。

然而，早期血管生成是受限制的，只有当肿瘤细胞变得有侵袭性，穿透基底膜，并获得与间质细胞直接而密切的接触才开始大量生成血管（图 13.40），这表明肿瘤的侵袭和血管大量生成是紧密相连的两个过程。我们将在下一章详述肿瘤侵袭。

在许多类型的人类肿瘤中，显微镜下平均每个视野中的毛细血管密度会随着肿瘤的恶性程度增加而增加。例如，在体积较大的人乳腺癌中，那些能够吸引密集的毛细血管

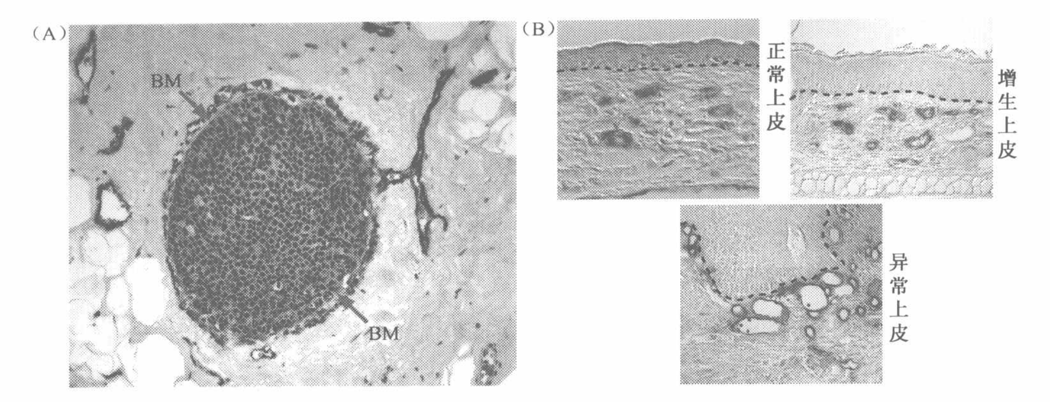


图 13.38　肿瘤进展早期穿越的基底膜信号转导　(A) 一例人原位乳腺导管癌 (DCIS) 包含了很多非浸润性的肿瘤细胞 (紫色)，因而未突破包围并将其与乳腺间质分离的基底膜 (BM)。尽管如此，DCIS 成功地将血管生成信号从 BM 传导至附近的间质，从而导致小血管 (暗棕色) 的形成。由于 BM 的连续性和完整性，这些血管是围绕而非进入肿瘤内部。(B) 在皮肤癌的转基因鼠模型中，人早期乳头瘤病毒-16 (HPV16) 在 *keratin-14* 基因的启动子调控下表达。在肿瘤的早期增生阶段，上皮侧 (上方) 非浸润的肿瘤细胞可以将信号传递到 BM (阴影线)，从而在间质侧引发血管生成，CD31 抗原显示毛细血管密度的增加 (红色) 可以证实这一点。在发生异常增生的组织中，BM (阴影线) 尚未突破时，其附近的间质显示出更强烈的血管生成。(A, courtesy of A. L. Harris; B, from L. M. Coussens, W. W. Raymond, G. Bergers et al., Genes Dev. 13: 1382-1397, 1999.)

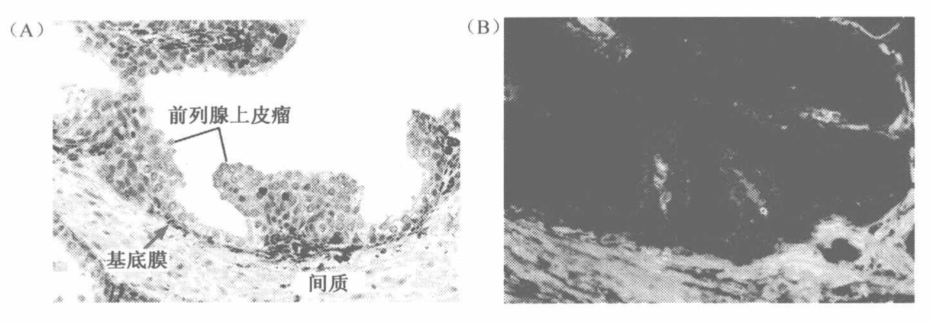


图 13.39　基底膜间质侧招募成肌纤维细胞　成肌纤维细胞也能够促进血管生成，部分通过其招募内皮前体细胞 (EPC) 到肿瘤间质。(A) 人前列腺上皮瘤 (PIN)——对应于原位乳腺导管癌 (DCIS)-的肿瘤细胞 (深蓝色细胞核) 滞留于完整的基底膜 (BM) 的上皮侧，但其已经刺激了 BM 外侧间质成纤维细胞的聚集，如图所示表达波形蛋白 (深褐色) 的成纤维细胞。(B) 双色免疫荧光实验证明许多同时表达波形蛋白 (红色) 和 α-平滑肌肌动蛋白 (绿色) 的间质细胞是成肌纤维细胞 (黄色)。这些细胞也可通过表达 I 型胶原蛋白被证明为成肌纤维细胞 (未显示)。(From J. Tuxhorn, G. E. Ayala, M. J. Smith et al., Clin. Cancer Res. 8, 2912-2923, 2002.)

网到肿瘤内部的患者的预后，在平均水平上比那些肿瘤内部血管很少的患者预后差得多 (图 13.41A)。而且，在最初诊断及后续治疗之后大量表达 VEGF (HER2 阴性) 的乳腺癌患者预后较差 (图 13.41B)。总之，这表明血管生成开关仅是使肿瘤逐渐发生血管生成并加速血管系统形成的诸多阶段中的第一步。

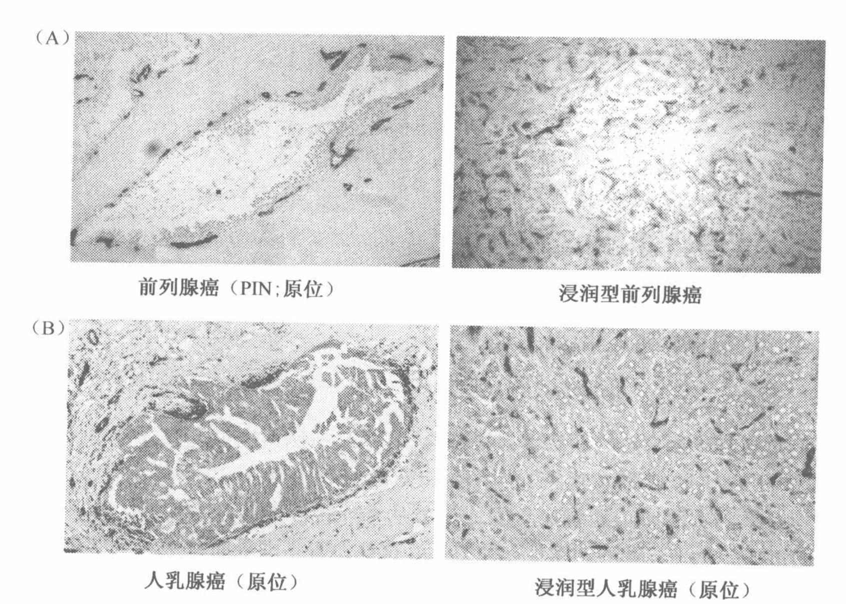


图 13.40 肿瘤获得侵袭性前/后的血管生成 肿瘤血管生成在人类肿瘤保持良性的过程中是受限制的。然而，一旦其变得具有侵袭性，血管生成的密度就增加了，导致高密度毛细血管（褐色）穿过肿瘤进行生长。(A) 良性前列腺上皮细胞瘤（PIN）中的毛细血管远少于那些浸润型前列腺癌（右侧）。(B) 类似的，那些原位乳腺导管癌（DCIS；左侧）中的毛细血管远少于浸润型导管癌（右侧）。(A，courtesy of J. Folkman；B，from N. Weidner，J. P. Semple，W. R. Welch and J. Folkman，N. Engl. J. Med. 324：1-8，1991.）

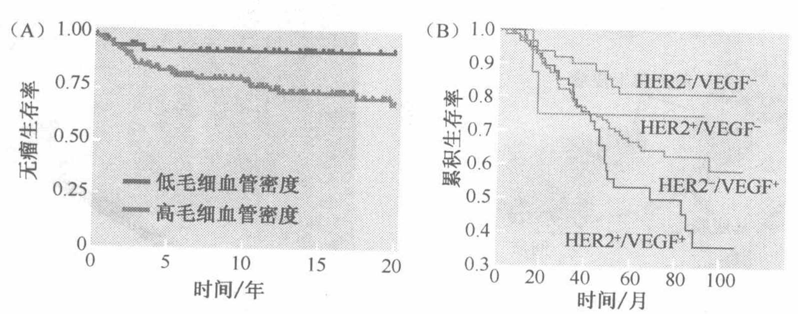


图 13.41 临床结果与血管生成密度 (A) 乳腺癌毛细血管密度分析（微血管计数），即显微镜下每个视野中毛细血管的数目。Kaplan-Meier 生存曲线证明，与微血管数量低的乳腺癌患者相比（红色曲线），微血管数量高的患者首次确诊后 20 年内的无瘤生存率显著降低（蓝色曲线）。(B) 如先前明确的（图 4.6），HER2/Neu 过表达的乳腺癌患者预后显著低于低表达患者。在该分析组中，所有患者乳腺附近一个或者多个淋巴结均有转移性的肿瘤细胞。当检测由肿瘤产生的 VEGF 水平时，这种生存期的差异更加明显。在该小规模临床研究中，超过 80%的肿瘤表达低水平的 HER2/Neu 和 VEGF 的患者在确诊后仅存活 8 年。反之，仅 35%的表达高水平的 HER2/Neu 和 VEGF 的肿瘤患者在此时存活。(A，from R. Heimann and S. Hellman. J. Clin. Oncol. 16：2686-2692，1998；B，from G. E. Konecny，Y. G. Meng，M. Untch et al.，Clin. Cancer Res. 10：1706-1716，2004.）

这些显著相关性可以有两种不同的解释：一种是密集的血管生成使得肿瘤细胞生长

更快速，从而导致较差的临床预后；另一种解释是密集的血管生成仅仅是肿瘤恶性程度的一个标志，并没有促使肿瘤向更高级别进展的作用。现有的临床数据并不能在二者中给出定论。

我们已经阐述了血管生成开关好像使少量的肿瘤细胞在血管生成开启后可以增殖并最终占据肿瘤大部分体积，从而使得肿瘤整体上均有血管生成表型。但是，通过分析从人移植瘤中分离出来的细胞，发现不同亚群的肿瘤细胞在血管生成能力方面有很大的异质性，一些肿瘤细胞血管生成能力很强，而另一些则不是。即使在肿瘤细胞系中，单个的亚克隆细胞群在体内移植的时候显示不同的血管生成能力（图 13.42）。这就提出了另外一个观点，即在一个肿块中血管生成开关开启后，血管生成能力较弱的肿瘤细胞依赖于那些血管生成能力较强的邻近细胞的帮助，从而获得充足的血管结构。

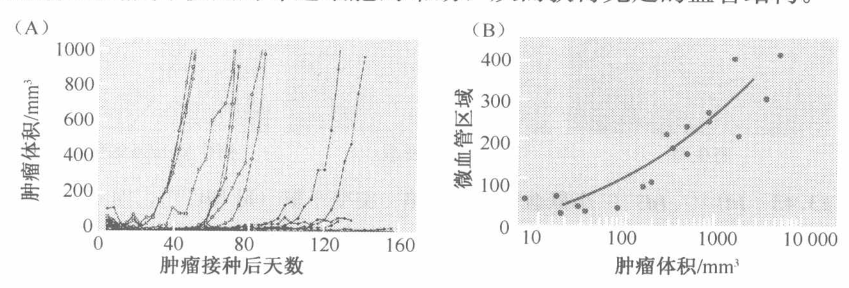


图 13.42　肿瘤细胞群血管生成能力的异质性　（A）人脂肪肉瘤细胞系一群细胞被分成单细胞克隆（每一个细胞克隆中的细胞均来自一个共同的祖先），当移植这些单克隆肿瘤细胞到免疫缺陷小鼠中，不同克隆的细胞群显示其形成肿瘤的能力存在很大差异（独立曲线）。（B）当分析这些单克隆形成的肿瘤的微血管密度（显微镜下每个视野的血管数量）和肿瘤体积时，发现它们明显有不同的血管生成能力，这限制和决定了形成肿瘤的能力。（From E. G. Achilles, A. Fernandez, E. N. Allred et al., J. Natl. Cancer Inst. 93:1075-1081, 2001.）

血管生成开关的作用不仅仅影响肿瘤的附近组织，也可影响到远处的组织。首先，肿瘤相关血管可以从已经存在的血管中伸展出来，到达临近的正常组织。在该过程中，内皮细胞很可能通过已经锚定在已有血管上的内皮细胞前体进行增殖从而形成新血管。然而，随着肿瘤进展，新血管的生成对于招募起源于骨髓且通过循环游走到肿瘤的内皮前体细胞（EPCs）的依赖性很可能极大增加。

肿瘤释放 VEGF 进入循环系统，从而刺激骨髓产生 EPCs 并吸引其进入到肿瘤。前一节（13.4 节）中讲到，间质成纤维细胞释放的间质衍生因子-1（SDF-1，也称 CX-CL12）可以协助此招募过程。一旦其到达肿瘤，EPCs 即被诱导分化为功能性的内皮细胞，并参与构建肿瘤相关血管系统。细致的分析显示，与附近毛细血管中产生的 EPCs 相比，来源于循环的 EPCs 的内皮细胞，不同种类肿瘤之间有很大差别。

动态招募 EPCs 的动力学可由缺少一个拷贝的 *Id1* 和缺少两个拷贝的 *Id3* 基因的小鼠的行为进行生动的说明。*Id* 基因编码的转录因子调节多种类型细胞的分化（8.11 节），许多该类型的突变小鼠存活到成年并显示特殊的表型：其在新血管的生成上有缺陷，而且多种移植瘤在这些小鼠体内不能生存（图 13.43A）。

这些 $Id1^{+/-}$、$Id3^{-/-}$ 基因型小鼠的缺陷可以通过移植野生型小鼠干细胞至其骨髓

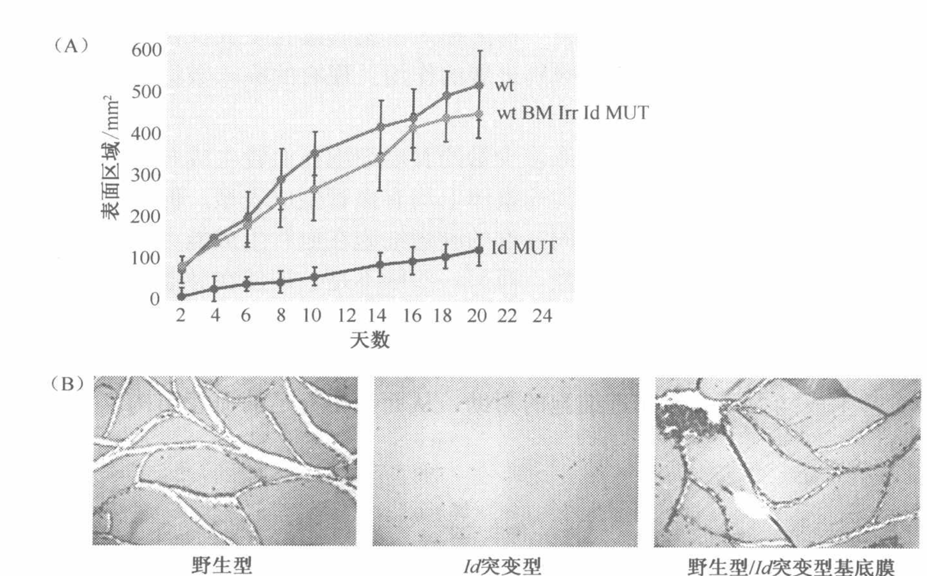


图 13.43 *Id1*$^{+/-}$ *Id3*$^{-/-}$小鼠血管生成缺陷 突变小鼠（Id MUT），即 4 个 *Id* 基因（Id1～Id4）中缺少三个（*Id1*$^{+/-}$ *Id3*$^{-/-}$基因型），从骨髓动员内皮前体细胞（EPC）的能力降低，因此削弱了循环的 EPC 被招募到肿瘤。（A）Lewis 肺癌（LLC）细胞系致瘤的野生型（wt）小鼠肿瘤生长迅速（红色曲线），而突变细胞系（Id MUT）则不支持肿瘤的快速生长（棕色曲线）。如果通过放射线照射去除突变细胞系致瘤小鼠的骨髓并移植野生型小鼠的骨髓（蓝色曲线，wt BM Irr Id MUT）则可逆转这种缺陷，这表明突变小鼠招募骨髓来源细胞的能力存在缺陷，从而使肿瘤不能在其中生长。（B）这种招募的缺陷可以进行定位，即利用充满 VEGF 后皮下灌注的 Matrigel（一种胞外基质成分）定位。当这些 Matrigel 被灌注到野生型的小鼠中（左）可以招募新生血管，但是在突变的小鼠中则不能（中）。然而，如果突变小鼠接受了野生型小鼠的骨髓移植，这种缺陷可以被恢复，存在于这些 Matrigel 中的血管生成与野生型类似（右）。（From D. Lyden，K. Hattori，S. Dias et al.，Nat. Med. 7：1194-1201，2001.）

而得以恢复（图 13.43A），还可以通过高水平循环的 VEGF 刺激骨髓干细胞，收获野生型小鼠骨髓并移植到 *Id1*$^{+/-}$、*Id3*$^{-/-}$小鼠实现恢复。之后，这些小鼠在循环过程中会产生大量的内皮前体细胞（EPCs）。而且，接种肿瘤细胞后很快也会产生肿瘤。这些观察结果表明，这些肿瘤依赖于 VEGF 从骨髓（图 13.43B）动员 EPCs 并招募循环细胞到肿瘤。这些发现和另一些成肌细胞前体被招募到肿瘤间质的证据（信息栏 13.3）表明，原发肿瘤在转移之前其影响就已经到达了身体的其他部分。

13.9 血管生成通常被生理抑制剂所抑制

在精细调节的生理过程中，正向效应必须由负调节因子所平衡，如 VEGF 和 bFGF，其拮抗剂到目前仍不清楚，但其重要性与所拮抗的血管生成因子同样重要。

例如，在伤口愈合的过程中，修复损伤位点的血管暴发式生长必须在新生成的毛细

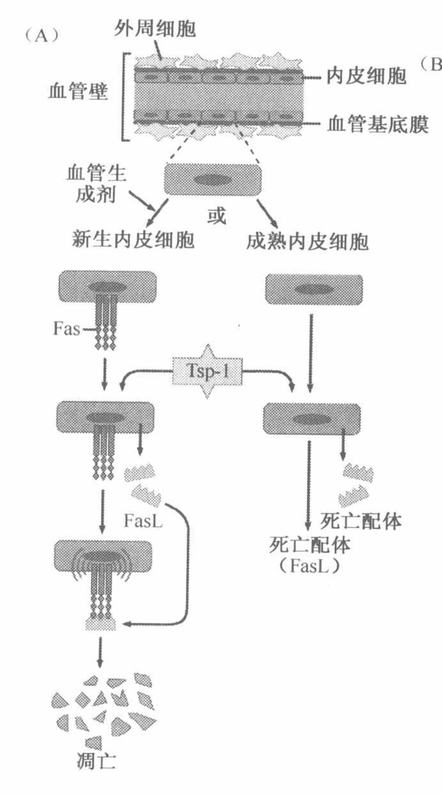
血管到达一定密度并足以支持正常组织的时候停止，这种停止作用至少有一部分是通过抑制转录因子 HIF-1 实现的。这些毛细血管的组装是在低氧条件下诱导的，且一旦氧供应恢复正常，伤口处的血管生成即停止（7.12 节）。

此外，组织利用大量胞外基质的组分阻止过多的血管生成（表 13.3）。凝血酶-1（Tsp-1）是最有代表性的一个蛋白，该蛋白可由许多类型细胞分泌到胞外空间，形成同源三聚体并执行一系列不同的功能。值得讨论的是，Tsp-1 与内皮细胞表面的一个受体（称为 CD36）相互作用阻止其增殖。另有研究显示，Tsp-1 处理内皮细胞使其诱导释放 Fas 配体（FasL），这是一个可以通过结合到 Fas 死亡受体促凋亡的信号蛋白。一旦 Fas 死亡受体与其配体结合，就可以激活胞内 caspase 级联反应从而诱发凋亡（9.14 节）。因此，Tsp-1 引发内皮细胞释放 FasL，后者以自分泌的方式引起这些表面表达 Fas 受体的细胞死亡。

表 13.3　内源性血管生成抑制剂

抑制剂	描述
A 起源于胞外基质	
Arresten	血管基底膜 IV 型胶原 α_1 链片段
Canstatin	血管基底膜 IV 型胶原 α_2 链片段
EFC-XV	血管基底膜 XV 型胶原片段
Endorepellin	Perlecan 片段
Endostatin	XVIII 型胶原片段
Anastellin	Fibronectin 片段
Fibulin	基底膜蛋白片段
Thrombospondin-1 和-2	ECM 糖蛋白
Tumstatin	IV 型胶原 α_3 链片段
Chondromodulin-1	Cartilage ECM 组分
Troponin 1	Cartilage ECM 组分
B 非基质来源	
生长因子和细胞因子	
Interferon-α（IFN-α）	细胞因子
Interleukins（IL-1β，-12，-18）	细胞因子
Pigment epithelium-derived factor（PEDF）	生长因子
Platelet factor-4	血小板脱粒过程中释放
其他类型	
Angiostatin	血纤维蛋白溶酶原片段
Antithrombin III	抗凝血酶 III 片段
2-Methoxyestradiol	内源性雌激素代谢物
PEX	MMP-2 片段
Plasminogen Kringle 5	Angiostatin 片段
Prolactin fragments	特异切割片段
Prothrombin Kringle 2	前凝血酶原片段
sFIt-1	VEGF-R1 可溶形式
TIMP-2	基质金属蛋白酶-2 抑制剂
TrpR5	色氨酰-tRNA 合成酶片段
Vasostatin	Calreticulin 片段

有趣的是，Fas 受体在内皮细胞活跃增殖或者刚停止增殖时表达。一旦这些内皮细胞已形成成熟的毛细血管并恢复到静止状态后，Fas 受体的表达将会受到抑制（图 13.44A）。这似乎可以解释 Tsp-1 功能中最令人迷惑的一面：其选择性诱导新形成的和正在生长的毛细血管的衰退，但是对于已成熟的毛细血管几乎没有作用。事实上，一些其他的天然抗血管生成因子也表现出这样的选择性。这些抗血管生成因子的作用也是依赖于激活内皮细胞促凋亡的 caspase 级联途径，因为抑制 caspase 酶活性的化合物也保护内皮细胞免受 Tsp-1 抗血管生成和其他血管生成的天然拮抗者的作用。



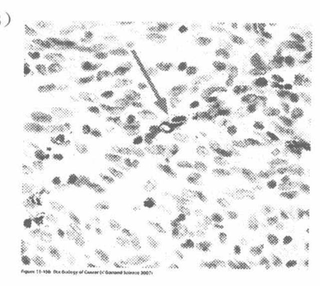


图 13.44　血小板反应蛋白、内皮细胞存活与肿瘤发生
（A）用血管生成试剂刺激静止的内皮细胞，例如，VEGF 或者 bFGF，引起内皮细胞活化、生长（左支），然后在其表面表达 Fas 死亡受体。接下来，用 Tsp-1（蓝色）处理成熟的和最新形成的内皮细胞，均导致这两组细胞分泌 Fas 的配体 FasL（绿色）。然而，由于只有活化的内皮细胞才表达 Fas 受体，所以这类细胞优先被 Tsp-1 诱导进入凋亡。这可以解释为 Tsp-1 可以阻止新血管生成，而对已经形成的血管系统影响很小，因为其中活化生长的内皮细胞几乎很少。（B）*Ras* 癌基因表达下降可以导致 *Tsp-1* 基因迅速表达。这解释了在黑色素瘤转基因鼠模型中，关闭 *ras* 癌基因的表达致使肿瘤相关血管的迅速瓦解和肿瘤衰退。TUNEL 凋亡实验（见补充材料图 3B◎）显示退行性黑色素瘤毛细血管（箭头）内皮细胞的凋亡。（A，adapted from O. V. Volpert，T. Zaichuk，W. Zhou et al.，Nat. Med. 8：349-357，2002；B，from L. Chin，A. Tam，J. Pomerantz et al.，Nature 400：468-472，1999.）

p53 可强烈诱导 *Tsp-1* 基因转录，似乎是 p53 诱导的应急反应导致了细胞增殖和肿瘤生长的停止。相反，几乎所有的人类肿瘤（第 9 章）的 p53 功能的丧失，导致 Tsp-1 水平急剧下降，使得通常应该被胞外基质中高浓度的 Tsp-1 抑制的细胞生成血管。

Ras 癌蛋白通过复杂的信号级联途径，以一种相反的方式作用，因为其可以导致 *Tsp-1* 基因表达的关闭。缺少 Tsp-1 可以促使 ras 转化细胞的血管生成能力比正常细胞显著增强。在一项对转基因小鼠黑色素瘤的研究中，诱导肿瘤生成的 H-*ras* 癌基因的表达在肿瘤长到较大时突然停止。这些血瘤随后很快瓦解，究其原因是其丢失了功能性的血管系统，这些血管在 Ras 功能丧失 6h 后开始瓦解（图 13.44B）。形成肿瘤血管系统的内皮细胞迅速进入凋亡且早于 VEGF 水平的下降（为内皮细胞提供存活信号）。但这

些实验中没有直接证明，似乎这种凋亡是由 *ras* 基因关闭后迅速再次表达 Tsp-1 引起的。

Tsp-1 毫无疑问是血管生成的一个重要监控者，但是以上结果提示，该分子仅仅是细胞间隙中存在的众多天然血管生成抑制剂的一员（表 13.3）。一些原发肿瘤和其起源的转移灶首次揭示了其他抗血管生成分子的存在。在一些肿瘤小鼠模型中，只要产生转移灶的原发瘤继续生长，转移瘤就会维持较小的体积。然而，当原发肿瘤被手术切除时，转移灶开始旺盛生长。这种行为被肿瘤外科医生当作轶事趣闻，他们观察到当手术成功切除原发肿瘤后，转移灶实质性数量会在几个月内突然爆发式增长。

这些观察结果表明，原发肿瘤可释放一些类型的抑制物，通过体液循环抑制转移细胞的增殖。更明确的是，这些抑制因子，无论本质是什么，似乎在次级生长中阻止血管生成，使其不能扩张伸展多于 1/10mm。一旦原发肿瘤被切除，假定的抑制因子在循环中消失，去除了对已锚定的转移灶生长的抑制。

后来被广泛研究的 angiostatin 和 endostatin 分子最初是从罹患肿瘤的动物的尿中分离得到的。对这两个蛋白氨基酸序列进行测序发现，它们来源于胞外基质（ECM）或者血浆中已知蛋白的切割产物。近年来，仍有其他抗血管生成物质被分离（表 13.3），许多是通过水解胞外基质蛋白形成的。综上所述，这些发现暗示了血管生成在正常组织发育和伤口愈合中进行，该过程最终由胞外空间的抗血管生成蛋白片段聚集所终止。这些自然产生的抗血管生成物质是保证组织不形成过多的血管系统的负反馈环的重要组成部分。

包绕大部分血管系统的基底膜是一些有潜在抗血管生成能力蛋白的来源。蛋白水解切割 XVIII 型胶原产生 20kDa 的 C 端片段，被鉴定为 endostatin。另一个蛋白 tumstatin，来自于切割 IV 型胶原一条支链（组成几乎一半的血管基底膜系统）产生的 28kDa 片段。切割 IV 型胶原还产生了一个称为 arresten 的抗血管生成蛋白。切割 plasminogen（plasmin 蛋白酶前体参与 coagulation 激活）产生 38kDa 被称为 angiostatin 的片段。

另一类重要的天然抗血管生成蛋白的功能是拮抗基质金属蛋白酶（MMP）。VEGF 刺激原位产生 MMP 1-4，促使毛细血管伸展并侵袭到胞外基质。称作组织金属蛋白酶抑制剂（TIMP）的一系列分泌蛋白，可以通过阻止这些或者其他的 MMP 发挥作用来阻止毛细血管的延伸。例如，研究者在肿瘤细胞中强制异位表达 TIMP-2，阻止了血管生成以及这些细胞的肿瘤生成能力。然而，TIMP 阻止血管生成的详细机制仍然未被阐明（信息栏 13.8）。

信息栏 13.8 TIMP 通过多条途径抑制血管生成 越来越多的证据显示，TIMP 可以作用于除 MMP 以外的分子靶点。例如，内皮细胞对两个关键血管生成生长因子（VEGF 和 FGF）反应所需的受体，也能够被 TIMP-2 所抑制。有证据显示，这种受体的拮抗作用通过非常间接和迂回的途径进行：TIMP-2 结合到细胞表面的整联蛋白，后者通过其胞质尾端激活胞内磷酸酶，从而去磷酸化并关闭 VEGF 和 FGF 受体的下游激活途径。TIMP 如此多样的抗肿瘤活性使其成为有吸引力的抗肿瘤治疗靶点。然而，尽管有不计其数的研究和发展项目，但仍没有任何一个 TIMP 或者 TIMP 类似物在临床上被证明是肿瘤进展的有效拮抗剂。

已证实最天然的血管生成抑制剂是色氨酰-tRNA 合成酶的变异体。该酶通常负责利用色氨酸标记 tRNA，因此是蛋白合成装置的一个核心组分。然而，编码这个酶的另一个剪接体的 mRNA 可以产生这个蛋白的截短形式，称作 mini TrpRS，可以由细胞分泌产生，也可由干扰素处理细胞诱导产生。该蛋白可以特异诱导内皮细胞凋亡，成为利用现成的、经过改进的物质解决特定生物学问题的典范。

当整合这些信息时，在血管生成的生理调节中观察到的不同现象强化了这样一个之前提及的概念，血管生成不是一个二元的状态——开或者关。相反，不同类型的肿瘤细胞获得或多或少的血管生成能力，甚至即使在特定的肿瘤中，肿瘤细胞也很可能显示出不同的吸引血管系统的能力。这样的行为可以被解释为促血管生成和抗血管生成因子之间的平衡决定了新生血管生成是否会继续，以及肿瘤内多大的区域会被血管覆盖（图 13.45）。

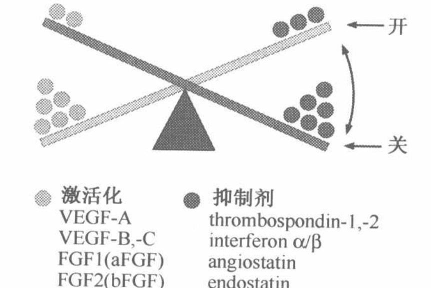


图 13.45 血管生成开关平衡 该图表代表了在组织中促进或者抑制血管生成的主要生理调节者，表明正是这两组相互拮抗的调节者的平衡决定了血管生成是否进行。虽然这里描述的血管生成开关基本上是一种开—关的二元选择，但实际上生长在肿瘤内部的血管系统在开关激活后显示出不同的发育程度。（From D. Hanahan and J. Folkman，Cell 86：353-364，1996，and courtesy of D. Hanahan.）

13.10 特定的抗血管生成治疗肿瘤策略前景广阔

一个系统越复杂，其对于各种类型的干扰就越敏感。在此描述的血管生成过程，明显属于高度复杂系统，表现为它依赖于多种类型的细胞和信号分子。事实上，当我们研究一些重要的血管生成因子时，至少有多个因子参与了不同类型的血管生成（表 13.2）。

对于那些有意发展新类型的抗肿瘤策略的研究者来说，这种复杂性提供了多种干扰靶点。高度靶向的治疗策略可以被设计用于抑制几种细胞类型，它们参与血管生成以及多条可以相互交流的信号通路。既然肿瘤完全依赖于血管生成才长成特定大小（直径约 0.2mm），任何可以成功阻止血管生成或者消除血管生成的药物应该代表治疗肿瘤的高度有效策略。（一旦它们的血管供给者被破坏）微小肿瘤的生长应该被抑制以防止其长大，而较大体积的肿瘤将瓦解。

原则上讲，抗血管生成治疗相对于针对肿瘤内癌细胞的治疗有较大优势。我们将在 16 章讲到，抗肿瘤药物发展的一个重要挫折来自于最初对于药物治疗有反应的肿瘤迟早将会对药物的进一步治疗产生**耐受**。这样的耐受性几乎总是由于肿瘤细胞群开始出现耐药变异体；这些变异体的产生频率几乎是可以预测的，接着进入增殖过程并导致肿瘤体积的激增。药物抗性变异体的产生似乎是肿瘤细胞基因组高度不稳定性的一个结果（12.11 节和 12.12 节），这些变异体获得比较高频率产生突变体的能力。

许多抗血管生成的治疗与之完全相反，是直接杀死被招募到肿瘤内部的遗传学正常的细胞。有足够的理由相信肿瘤内部的内皮细胞有正常而稳定的基因组并呈现稳定的表型。因此，直接针对这些细胞的药物治疗不可能选择药物抗性变异体的生长，肿瘤在理论上也不应该对抗血管生成药物治疗产生抗性（信息栏 13.9）。

信息栏 13.9　肿瘤可能比最好的抗血管生成治疗策略更聪明　大部分抗血管生成治疗的引人之处在于将要被治疗的细胞尤其是内皮细胞不可能产生抗药性突变体。然而，信号途径的复杂性可能使肿瘤能够绕开即使是最精明的抗血管生成治疗。例如，想象我们设计了一种策略阻碍促进肿瘤新血管生成以及后来对血管起保护作用的 VEGF 信号转导途径（因为 VEGF 对于内皮细胞存活是必需的）。以这种方式治疗的肿瘤应该迅速瓦解，因为其血管床将会碎裂。事实上，这样的反应已经在 Rip-Tag 胰腺癌小鼠中被观察到（图 13.36）：当用抗 VEGF-R2 的抗体治疗时，其大于 50%肿瘤消退。然而，残留的存活肿瘤细胞获得了可产生高水平成纤维生长因子（FGF）的突变体，成纤维生长因子又是潜在的血管生成因子，这些生长因子将代替 VEGF 将信号从肿瘤传到内皮细胞并成功触发血管系统的重生，反过来又促进了生长因子的活化。因此，真正有效的抗肿瘤生长治疗将需要抑制多重血管生成途径。

抗血管生成治疗很有吸引力的另外一个原因，是由于其可选择性地杀伤肿瘤内增殖的内皮细胞，因为这些肿瘤的许多血管看起来总是处于形成和瓦解的状态，其可能对毒性药物敏感而正常组织中的静止内皮细胞却不受损。例如，正常和肿瘤相关血管截然不同的生长状态在许多小鼠肿瘤模型中都存在，其中移植肿瘤的血管生长迅速。然而，可能许多在人类生长缓慢的肿瘤中的血管可以存活很多年，有足够充裕的时间巩固和成熟进而旺盛生长。构造好的血管，它们在内皮细胞内更新缓慢，这些肿瘤相关血管可能与身体别处正常血管同样对抗血管生成药物耐受。

针对肿瘤相关的内皮细胞进行治疗时，上述影响可因这些细胞的特殊生物学性质进一步增强。肿瘤中变异体不断地形成和丢失，半衰期仅有一周。而机体其他正常血管的相应内皮细胞几乎不分裂，而且半衰期达到数百天，有些甚至长达 7 年。循环细胞（如进入细胞分裂周期的细胞）对药物诱导杀伤的敏感性几乎总是远远高于那些静止的细胞。鉴于这一原因，针对内皮细胞的细胞毒性治疗应当对肿瘤相关的血管系统有强烈的杀伤作用，而体内正常的血管则完好无损（信息栏 13.9）。

我们将在后续的第 16 章详细讲述抗肿瘤治疗的基本原则，这里介绍特异针对肿瘤相关血管的治疗措施，是一些该领域首次发现的，用于治疗小鼠来源肿瘤天然抗血管生成抑制剂。

既然这些物质（如 angiostatin 和 endostatin）是体内天然存在的，它们就具有被耐受而不产生毒副作用的优势。事实上，它们对于一系列细胞的体外增殖几乎没有作用，相反，仅对活跃参与体内新生血管生成的内皮细胞有生物学活性。而且，这些蛋白有时候在体液循环中持续存在，因此，增加了肿瘤血管暴露于抗血管生成作用的机会。从消极的一方面讲，像所有蛋白一样，其大量制造是昂贵和富于挑战性的，而其发挥作用的详细机制仍不清楚。

Angiostatin 和 endostatin 在阻止 Rip-Tag 胰腺小鼠的血管生成开启中的作用是非常有限的（13.7 节）。但是，当应用到已具有血管的小肿瘤时，endostatin 对其生长的

抑制超过了 80%，而 angiostatin 抑制了 50%。当用这些试剂治疗那些大的、发育良好的肿瘤时，几乎没有观察到任何效果，但是将二者同时导入可使这样的肿瘤体积减小 75%。长期的 endostatin 治疗可使肺癌细胞系在小鼠体内形成的移植瘤衰退。这或许表明 endostatin 可能成为肿瘤临床治疗的、高度有效的治疗方案。然而，这些小鼠的反应并不能预测在肿瘤临床治疗中有相似的功效。在早期临床试验中，仅在 endostatin 治疗的一小部分患者中产生了显著性的反应。

另一些天然血管生成拮抗剂（表 13.3）是干扰素，其常常被用于研究如何调节免疫系统不同细胞类型的活性。干扰素-α 和干扰素-β 均是高效的抑制血管生成的物质，已被证明可抑制血管生成促进因子碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）和白细胞介素-8（IL-8）的合成。有研究证明，使用干扰素-α 可引起一些内皮细胞起源（可能是内皮细胞形成的淋巴管）的肿瘤如血管瘤（内皮细胞瘤）以及 Kaposi 肉瘤等的衰退。在这两种情况中，肿瘤的衰退均可归结为干扰素的抗血管生成作用。

1991 年报道的一个实验预示了另一类抗血管生成治疗方案的成功。在该项研究中，肿瘤细胞释放修饰后的碱性成纤维细胞生长因子（bFGF），大大增加了其在小鼠中的致瘤性，只是因为 bFGF 增强了这些细胞的血管生成能力。使用特异结合并中和该 bFGF 的单克隆抗体（但是对小鼠内源的 bFGF 没有作用）封闭这些肿瘤细胞的血管生成活性，可以显著缩小肿瘤的体积。在两年内，用抗人 VEGF 单克隆抗体做过类似的试验，其成功地抑制了两种以裸鼠为宿主的人肉瘤细胞系以及恶性胶质瘤的增殖。

该治疗更现代的版本来自于 10 年后使用一种单克隆抗体结合并中和 VEGF-A。这种抗体有 Avastin 和 bevacizumab 两种名称，其在大规模临床实验中显示出显著的有效性。例如，使用这种抗体联合化疗（5-氟尿嘧啶）治疗转移性结肠癌患者，在平均水平上比单纯化疗的患者存活期长 4 个月。Avastin 联合目前的化学治疗将非小细胞肺癌（NSCLC）患者的存活时间延长了两个月。类似地，Avastin 可以延缓肾细胞癌患者的肿瘤进展，但是对于延长生存期无效。令人满意的是，Avastin 与当前的化学治疗相互协同的效果来自于 VEGF-A 抑制剂能使肿瘤相关血管系统改变（补充材料图 14 ◎），从而极大地协助药物进入到肿瘤组织。

一些合成的低分子量抗血管生成化合物已经被发现或者开发，其直接针对血管生成过程中不同的分子靶点。第一种是烟曲霉素，一种真菌来源的抗血管生成化合物，其临床衍生物是 TNP-470（表 13.4C）。这两种化合物被证明可以抑制体外和体内内皮细胞的增殖，表明其体内抗血管生成能力来自于其阻止依赖内皮细胞的新毛细血管的生长。重要的是，TNP-470 对于体外肿瘤细胞的增殖几乎没有影响，但是在小鼠中却强烈抑制其肿瘤形成能力。例如，该药物使 Rip-Tag 小鼠胰腺肿瘤的体积减小了 70%～80%。TNP-470 发挥作用的机制还不明确，但是正处于积极研究中，其被证明具有抑制内皮细胞中的甲硫氨酸氨基肽酶-2 的能力，这可能有助于解释其优先作用于此种细胞而对其他培养的细胞类型几乎没有作用。

表 13.4 血管生成抑制剂及其开发和临床应用

名称	状态	临床反应
A 内源性血管生成抑制剂		
Endostatin	临床试验	分散的反应
Interferons-α 和-β	在成血管细胞瘤治疗有效	Kaposi 肉瘤；对其余大部分肿瘤疗效有限
B 阻断 VEGF 和 VEGF-R 信号途径的试剂		
Avastin anti-VEGF MoAb	临床试验	肺癌可延缓肿瘤进展 1～3 个月，结直肠癌 3～4 个月
VEGF-R2 的抑制剂 SU5416（Flk-1）	放弃试验	严重的血管毒性
VEGF-R2 的抑制剂 ZD6474	临床试验	
VEGF-R2 的抑制剂 CP547，632	试验	
C 其他不同性质的药物		
Thalidomide	试验	抑制 bFGF 和 VEGF 依赖的血管生成
Squalamine sterol from shark liver	试验	强的抗血管生成活性
Celecoxib anti-inflammatory drug	试验	多重抗肿瘤生成作用
ZD6126	试验	拮抗内皮细胞骨架中的 tubulin
Fumagillin 和 TNP-470	试验，减缓肿瘤生长	拮抗内皮细胞蛋氨酸氨基肽酶
D ECM 降解的抑制剂——MMP 抑制剂		
Marimastat	临床试验	不能延缓肿瘤进展
Prinomastat	临床试验	不能减低肿瘤进展
BMS275291	临床试验	
BAY12-9566	临床试验	
Neovastat（shark cartilage MMP）	临床试验	

在转基因 Rip-Tag 胰岛肿瘤发生模型小鼠中使用合成的受体抑制剂（表 13.4B）为研究血管生成抑制提供了信息（13.7 节）。两种类型的低分子质量化合物已经被用于阻止不同阶段的胰岛肿瘤的进展。一种药物直接针对该肿瘤模型血管生成的主要受体 VEGF-R2。通过抑制该受体酪氨酸激酶的活性，称为 SU5416 的试剂可起到类似 Avastin（已经描述过的抗 VEGF 单克隆抗体）的效果，即可以关闭 VEGF 信号传导途径。第二种类型的药物，如 SU6668，主要针对 PDGF 受体酪氨酸激酶。我们在这里讨论 PDGF 的作用是招募平滑肌细胞到正在生长的毛细血管（信息栏 13.1），表明这些“腔壁”细胞对于巩固和加强新形成的毛细血管是非常重要的。

抗 VEGF-R 试剂 SU5416 可以抑制 90%早期的异型增生胰岛的血管生成，将其维持在小规模和非侵袭的状态（图 13.46C）。然而，SU5416 对于晚期的发育良好的肿瘤没有作用，尽管其同样是以高浓度存在，肿瘤仍将继续进展。因此，在血管生成的早期阶段，VEGF 信号途径起着十分关键的作用，后来该过程似乎逐渐不再依赖于 VEGF。

抗 PDGF 受体试剂 SU6668，在阻止异型增生胰岛血管生成开关启动的作用较弱，可将这类胰岛减少一半（图 13.46C）。但是，在处理晚期高级别肿瘤时，其远比抗 VEGF-R 药物更有效，可将这些肿瘤的体积减小一半并减少血管分布（图 13.46D）。重要的是，在这些肿瘤内部或者附近表达 PDGF-R 的细胞仅仅是毛细血管相关的周皮细

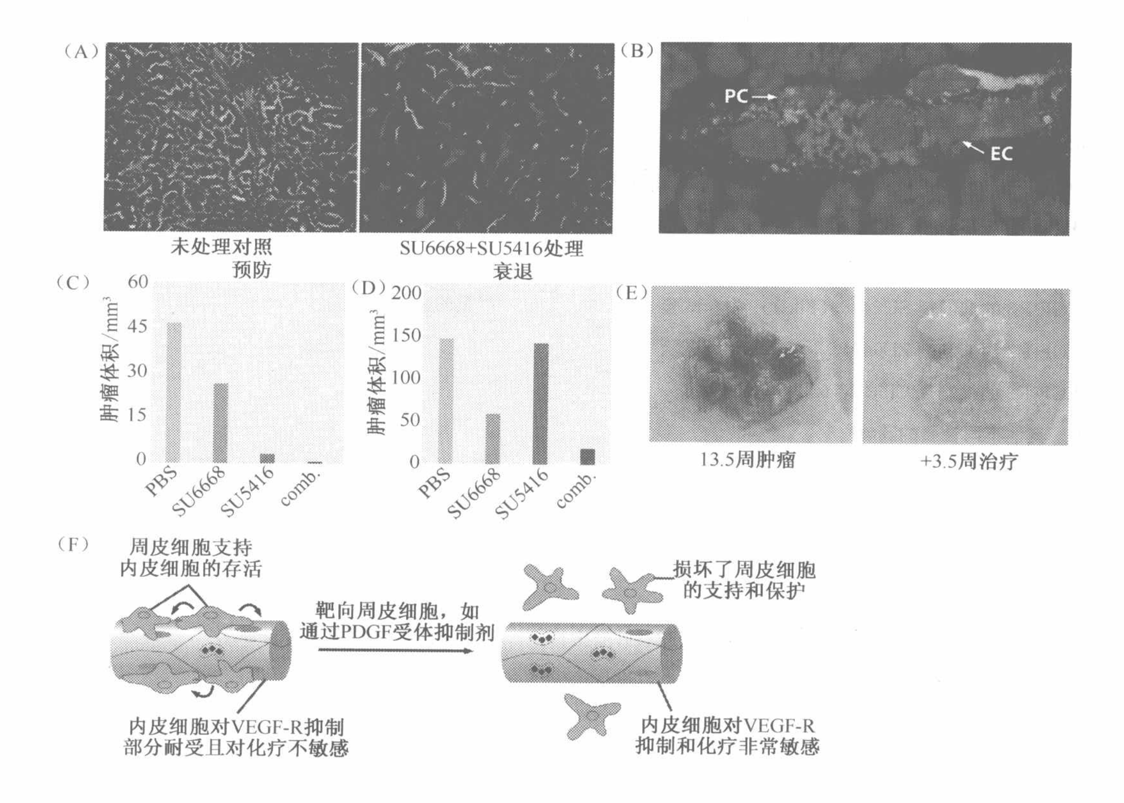


图 13.46 血管生成抑制剂治疗胰岛细胞癌 Rip-Tag 转基因鼠胰岛细胞癌变模型使得检测抗血管生成抑制剂成为可能。(A) 使用 PDGF 受体抑制剂 SU6668 联合 VEGF-R 抑制剂 SU5416 治疗小鼠胰岛细胞肿瘤（左）4 周导致血管系统的衰退（右）。毛细血管腔用黄色标记，红色标记为与之相关的血管平滑肌。(B) PDGF-R 抑制剂 SU6668 作用可以被追溯到其对周皮细胞的特异作用，即支持内皮细胞。在该图中，与 PDGF-R 结合的抗体揭示了胰岛中表达该受体的是周皮细胞（PC，绿色），其与内皮细胞紧密相连（EC，红色）。核染为蓝色。(C) 虽然单独使用 PDGF-R 抑制剂 SU6668（蓝色 bar）或者 VEGF 受体抑制剂 SU5416（红色 bar）均不能完全阻止这些肿瘤的形成，但二者联合则可以起作用（联合，紫色 bar）。PBS，磷酸盐缓冲液对照（绿色）。(D) 为使已形成的肿瘤衰退，单独或者联合使用 SU5416 和 SU6668 治疗 12 周龄的 Rip-Tag 小鼠，4 周后测量肿瘤的大小。单独使用 SU5416 对肿瘤体积减小的作用非常微弱，而单独使用 SU6668 效果则较明显（蓝色 bar），二者协同作用可以使肿瘤体积降低约 85%。这再次表明，内皮细胞的拮抗剂（依赖于 VEGF-R）与行使支持功能的周皮细胞的拮抗剂（依赖于 PDGF-R）可以协同作为抗血管生成的治疗策略。(E) 可以看到两种药物联合治疗的效果：当患有胰岛癌的 13.5 周龄小鼠的肿瘤接受该方案的治疗（红色，左侧）3.5 周后，肿瘤基本上消退（右侧）。(F) 该示意图总结了内皮细胞依赖于紧密排列的周皮细胞的各种生物学支持。通过特定的抑制剂抑制 PDGF 信号传导途径将导致周皮细胞与内皮细胞分离，使得后者对不同类型的后续治疗敏感，包括抑制 VEGF-R 的功能。这就强调了一个事实，即两种治疗方案的联合应用是抗血管生成最有效的策略。（A，B，and E，from G. Bergers，S. Song，N. Meyer-Morse et al.，J. Clin. Invest. 111：1287-1295，2003；C and D，courtesy of D. Hanahan；F，from K. Pietras and D. Hanahan，J. Clin. Oncol. 23：939-952，2005.）

胞和平滑肌细胞（图 13.46B），表明这些“腔壁”细胞是 SU6668 发挥作用的靶点。事实上，显微镜检证明 SU6668 已经阻止了这些“腔壁”细胞与内皮细胞毛细血管相互作用并加强其成管能力。总之，这些实验证明血管生成的起始步骤可以在无 PDGF 受体功能的条件下顺利进行，但是在后续的肿瘤形成过程中，PDGF 信号转导途径以及“腔壁”细胞的参与，对于血管生成和肿瘤体积的增加越来越重要。

使用这两种药物治疗的策略已经被证明是在干扰肿瘤形成的不同阶段高度有效的方法（图 13.46C 和 D）。因此，同时抑制 VEGF 和 PDGF 受体抑制血管生成开关，几乎将所有（>98%）胰岛阻止在血管生成前期。联合用药阻止 90%已有血管的小肿瘤的进展，并可使约 80%较大肿瘤衰退。另一种 PDGF-R 的抑制剂 Gleevec 也一样，这将在 16 章详细讨论。在一些小鼠中，这些药物的联合使用可以使已经形成的肿瘤体积维持在较小状态达两个月。

有意义的是，这些药物的联合使用实质上对邻近恶变胰岛的正常胰腺组织没有任何毒性，证明了肿瘤内新形成的毛细血管比正常组织发育良好的毛细血管更易受攻击而瓦解。此外，似乎 PDGF 在最初吸引周皮细胞到内皮细胞形成的毛细血管的过程中发挥重要作用，但在正常组织中 PDGF 信号通路的持续激活在维持这种关系中并非必需。这些观察表明，抑制血管生成并阻止肿瘤进展的有效途径很可能依赖于针对构成肿瘤相关毛细血管的一些细胞类型。

这些靶向抗血管生成治疗的结果说明此类治疗策略是非常有前途的。事实上，这种类型的治疗已经被使用了许多年：临床肿瘤学家所不了解的是，传统的抗肿瘤治疗的大部分疗效也来自于其抑制肿瘤相关微血管的作用。其中一个惊人的例子来自对于遗传上缺少编码 Bax 蛋白或者酸性神经磷脂酶小鼠的研究，该研究阐明了放射治疗如何成功破坏特定肿瘤。这两种蛋白是不同细胞类型的重要促凋亡调节者，内皮细胞是其中的重要一种。因此，与野生型小鼠相比，遗传学上改变的小鼠来源的内皮细胞对于毒性试剂有更强的抵抗力，包括 X 射线。

此处显示的实验中，小鼠肿瘤细胞—来自于纤维肉瘤或者黑色素瘤的细胞系—被导入野生型和 *asmase*$^{-/-}$ 型小鼠。当肿瘤已经长到较大体积时，这些动物被曝露在 15 Gy 的 X 射线剂量下进行照射（图 13.47A 和 B）。该放射剂量通常导致肿瘤体积的显著降低，而且确实在野生型小鼠中成功发挥作用。然而，以 *asmase*$^{-/-}$ 小鼠为宿主的，相同大小的肿瘤的反应截然不同，它们的生长并不衰退。在进一步实验中，用突变骨髓细胞替代 *asmase*$^{+/+}$ 的小鼠骨髓，肿瘤变得高度耐受 X 射线诱导的凋亡（图 13.47C）。

这些实验证明，肿瘤的放疗敏感性并不是肿瘤细胞自身固有的。相反，这由宿主细胞，尤其是那些从宿主骨髓招募移植瘤中的细胞所决定。这些招募的宿主细胞确实是内皮细胞，这可被下列事实所证明：①体外照射的小块肿瘤中内皮细胞凋亡与体内类似，并可以预测该肿瘤在体内的行为；②肿瘤中只有那些经照射后显示明显凋亡的细胞与毛细血管相关（图 13.47B）。

类似的观察表明，抗血管生成治疗已经在传统的抗肿瘤**放射治疗**中起着难以想象的重要作用。同样地，肿瘤相关微血管对这些药物的敏感性强烈影响特定类型的传统化学治疗的临床反应，这表明将来优化抗肿瘤化学治疗方法或许应更多考虑肿瘤相关微血管而非肿瘤细胞本身的反应性。

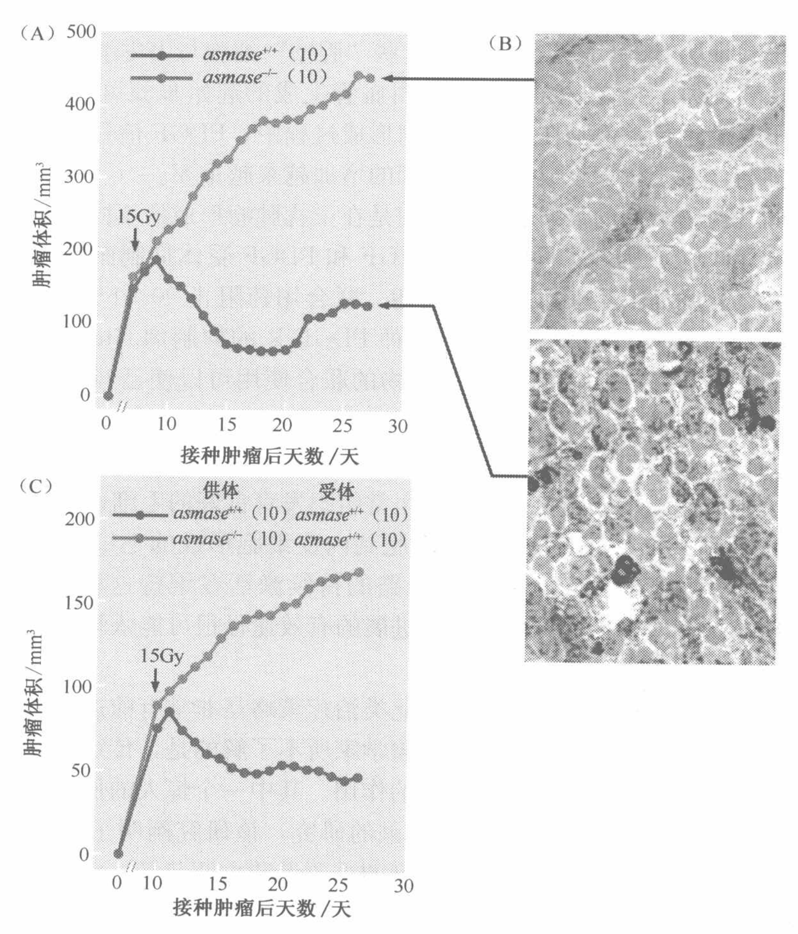


图 13.47　携带野生型和阴性酸性神经磷脂酶肿瘤小鼠的生存　肿瘤对放射治疗的反应性通常取决于形成其血管的内皮细胞对放射治疗的敏感性。野生型或者纯合缺失编码促凋亡酸性神经磷脂酶（asmase）的小鼠能够繁殖。当小鼠纤维肉瘤被移植到野生型和 *asmase*$^{-/-}$ 宿主中，肿瘤在突变小鼠中的生长速度是野生型小鼠的 2 倍，表明宿主的因素（如招募的内皮细胞）控制着肿瘤生长的速度。(A) 当这些肿瘤被给予一定的放射剂量（15Gy，箭头），野生型小鼠的肿瘤消退（红色实心圈），之后再一次生长。相反，*asmase*$^{-/-}$ 宿主的肿瘤（蓝色实心圈）继续生长而不衰退。(B) 放射治疗后在显微镜下观查这些肿瘤，TUNEL 染色指示野生型小鼠（下方）肿瘤的内皮细胞发生凋亡（棕色点），而 *asmase*$^{-/-}$ 宿主产生的肿瘤没有凋亡迹象（上方）。(C) 当野生型宿主的骨髓细胞通过移植被 *asmase*$^{-/-}$ 或野生型供体的骨髓细胞所代替时，移植了突变型骨髓的小鼠宿主体内的肿瘤（蓝色曲线）在 15Gy 射线（箭头）照射下继续生长，而移植了野生型骨髓的小鼠宿主体内的肿瘤在射线的照射下则停止了生长（红色曲线）。这证明了对放射线敏感的肿瘤由宿主骨髓细胞的来源决定，而不是肿瘤细胞自身。(From M. Garcia-Barros, F. Paris, C. Cordon-Cardo et al., Science 300: 1155-1159, 2003.)

13.11　总结与展望

后生动物组织由不同类型的、彼此交流的细胞构成并共管。发育生物学家认为很需要这样的组织设计，即只有通过不同类型的细胞相互作用，才能保证每一种类型的细胞

具有合适数目和定位。为了支持已经形成组织的维持和修复，这些异源相互作用在胚胎发生后仍然发挥作用。

我们已经在该章节中学到，这种组织设计会为生物体带来另一非同寻常的益处，通过使这些细胞相互依赖，没有一个可以轻易将自身从复杂的相互作用网络中解脱并独自离开。互相依赖利用这种严格控制避免肿瘤形成时引起的混乱。

我们过去将多步骤的肿瘤进展过程视为肿瘤细胞发展过程中需跨过的连续障碍物（第 11 章）。不论是通过遗传学或者表观遗传学改变，每一次成功地移开这些障碍物均可使肿瘤细胞的恶性程度加剧。现在，我们可以将多步骤的肿瘤进展重新定义为：在癌前细胞恶变过程中，其将逐渐切断与邻近细胞的联系及对它们支持的依赖。

或许最令人吃惊的是：尽管已经完成了肿瘤进展的多个步骤，大部分肿瘤细胞仍然依赖于间质的支持（信息栏 13.10）。许多肿瘤中的上皮细胞仍然依赖于在正常组织中维持其前体所需的多种生理学信号。这种保守性在显微镜下非常明显。因此，受过良好训练的病理学家可以识别镜下 95%的肿瘤标本的来源，因为绝大部分决定正常形态的异质性相互作用在大部分癌症中仍然有效。

信息栏 13.10　Kaposi 肉瘤细胞保持着其收到异源信号的数目的记录　Kaposi 肉瘤（KS）似乎来源于那些与产生淋巴血管内皮内层相关的细胞。KS 的诱因——人疱疹病毒-8（HHV-8）——当免疫防御不起作用后开始旺盛生长，这可以解释该肿瘤在 AIDS 患者中高频率出现（见信息栏 3.10）。几个实验室的基因表达分析证实，KS 细胞中编码 15 个不同受体的 mRNA 的表达增加；这些受体各自的配体似乎并不是由 KS 细胞产生的，表明这些受体的表达上调使得 KS 细胞可利用其附近细胞通过旁分泌提供的配体进行信号传导，包括结合到下列配体的受体：TNF-α、INF-γ、oncostatin M、bFGE、VEGF-C、VEGF-D、insulin、thromboxane A2、IL-2、IL-6、IL-10、IL-13、thrombospondin、VEGF 165、CXCL12 和 CSF-1（KS 细胞是否依赖于所有这些信号还没有被实验证实）。这种复杂性暗示组织学复杂的肿瘤（如 KS），可能依赖于多种异质性信号维持其增殖和存活。

剩余的大约 5%的肿瘤是一个挑战，因为其退行性发育导致大部分可能鉴定出其组织来源的组织学特征的丢失。这些退行性肿瘤中细胞的前体细胞已不依赖于附近的正常细胞。然而，大部分退行性肿瘤细胞并没有经历过完全独立的所有过程，因为其仍然能聚集形成实体肿瘤。最终的独立只有那些级别较高的、可以长到胸膜渗出液或者腹水的肿瘤细胞才能实现（补充材料 25 ◉），因此不再直接与支持细胞以及胞外基质接触。

即使没有异源相互作用的详细知识，从哺乳动物组织已知的生理学也可预测大部分的肿瘤细胞至少依赖于一种形式的间质支持：事实上它们均依赖于功能性的血液供应。较难预测的是肿瘤获得血管系统的机制。肿瘤组织通过积极招募构建毛细血管和大血管的内皮细胞而非侵袭正常的组织和剥夺已经存在的毛细血管床进行血管生成。

这些内皮细胞的来源也不能从第一条原则推理出来。内皮细胞在邻近组织中的增殖似乎是在血管生成开关启动后获得新生血管系统的主要机制。然而，在许多肿瘤中，大量的血管似乎是由起源于骨髓然后在肿瘤间质中分化成为功能性的内皮细胞所构建的。在不同肿瘤中这些循环的内皮前体细胞（EPCs）对于肿瘤相关血管系统的贡献似乎不尽一致，但很清楚的是，在多种肿瘤中它们是这些血管的重要来源。

人们对血管生成的许多方面仍然缺乏了解，甚至荒谬。例如，似乎一旦肿瘤开始血管生成，它们便可以长时间的生长和扩张，血管生成能力较强的肿瘤比那些新生血管能力差的肿瘤生长得更迅速。的确，就像我们读到的，测量微血管的密度（每个显微镜视野下毛细血管数量）与原发肿瘤，如乳腺癌，是否会高度恶化密切相关。

矛盾来自于频繁观察到的承受高度乏氧的肿瘤患者同样面临差的预后。若假定乏氧使肿瘤细胞饥饿并通过凋亡导致其死亡，并且进一步扩大肿瘤内的坏死区域的话，以上现象就无法解释。这种矛盾或许可以通过研究 HIF-1 转录因子的作用来解释，HIF-1 在乏氧细胞中被激活（7.12 节）并诱导 VEGF 及其他大量蛋白的表达。事实上，HIF-1的高水平表达也是临床预后差的指标。HIF-1 活化的基因包括 PDGF、TGF-α、TGF-β 和几个负责细胞外基质（ECM）重塑的基质金属蛋白酶（MMPs）。我们已经知道，其中一些分泌蛋白可作为潜在的有丝分裂原驱动上皮细胞和邻近间质的增殖。

另一个 HIF-1 诱导的基因编码 Met 蛋白，是干细胞生长因子（HGF）的受体，也称作分散因子（SF）。一旦 Met 受体被与其结合的 HGF 配体激活，将会激活上皮细胞中一系列不同的反应，包括上皮到间叶细胞的转变（EMT），增加细胞运动、侵袭和增殖。HGF 似乎在许多上皮和间质来源的人类肿瘤中广泛存在。因此，HIF-1 介导的 Met 表达增加增强了肿瘤细胞对其周围存在的 HGF 分子（如被间质细胞释放的 HGF）的敏感性。HIF-1 多方面的功能或许有助于解释乏氧肿瘤的预后差，因其可以克服这些逆境最终变得比其他氧供应充足的肿瘤更富有侵略性。

最近发现的肿瘤和骨髓的动态相互作用对于多数肿瘤研究者来说是个惊喜。大部分未发生转移的肿瘤，传统上被认为是一种局限于身体某个角落的局部疾病。但是，当我们对间质细胞的了解越多，则越意识到即使原位肿瘤在招募支持其自身生存和增殖的细胞的过程中，也必须扩展其影响到远处和全身。除了之前提到的内皮前体细胞（EPCs），肿瘤还从骨髓招募肥大细胞和单核细胞，并在此（on-site）分化为巨噬细胞。尽管一些间质成纤维细胞和肌成纤维细胞可能是骨髓来源的，但因为它们可能通常起源于循环前体细胞而被命名为纤维细胞。

我们本章的重点——肿瘤生理学，远比信号在上皮细胞和间质间双向交换复杂。后者由多于 6 种不同类型的细胞组成（成纤维细胞、成肌纤维细胞、内皮细胞、周皮细胞、平滑肌细胞、肥大细胞、巨噬细胞，在一些组织中还有脂肪细胞），每一种细胞发送信号到恶性上皮细胞以及间质的其他组分。物理学家奋斗多年，但至今为止还不能成功解决三体（three-body）问题。在这里，我们面对了多达 8 种或者甚至更多不同类型的细胞，每一种类型的细胞发送给其他类型细胞复杂的混合信号。我们仅是刚刚开始了解在恶性和正常组织中复杂的上皮-间质相互作用。

半个多世纪以来，肿瘤学家的研究兴趣集中于根除实体瘤内的肿瘤细胞，寄希望于治愈那些以往认为无法治愈的常见肿瘤。如我们在 11 章和本章介绍的，该想法需要从根本上转变。首先，抗肿瘤治疗的真正目标已经不再是肿瘤内大量的恶性细胞，因为其自我更新的能力是有限的。相反，我们可能会发现真正持久的疗效仅来自于根除隐藏在肿瘤团内部这里或那里的、仍然难以捉摸的肿瘤干细胞，它们是肿瘤自我更新的发动机。其次，许多将来需要发展的、有用的抗肿瘤治疗将不会针对肿瘤细胞本身；相反，通过攻击为其提供重要生理支持的细胞或许更有用；通过破坏大部分肿瘤细胞所依赖的

精细的间质支持网络，实体瘤真正显著的衰退或许会在某天得以实现（图 13.48）。

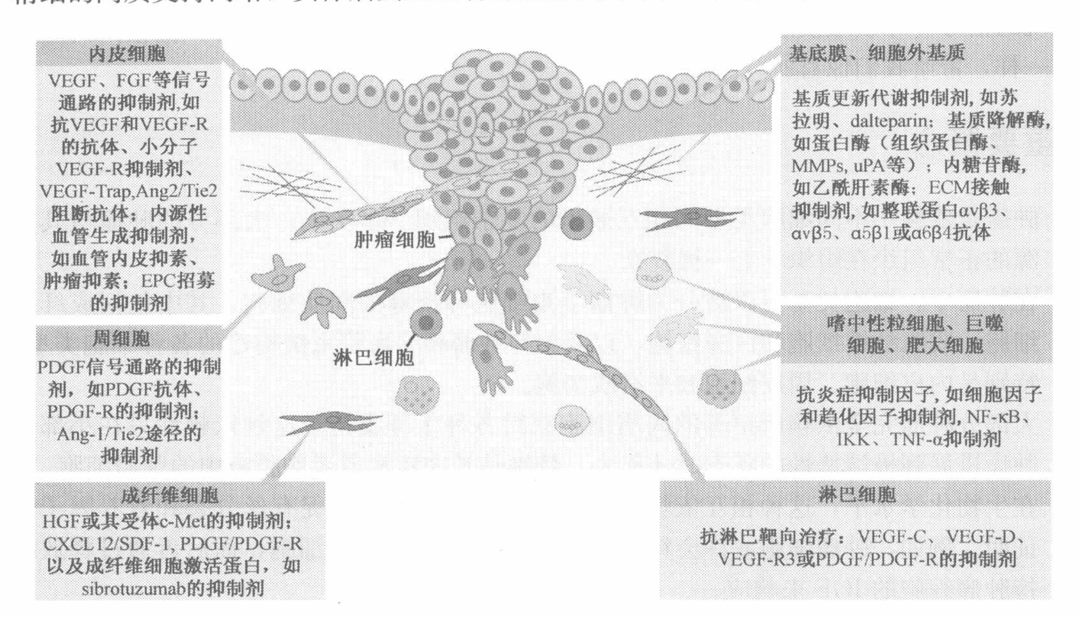


图 13.48　异型相互作用作为治疗干预的靶点　正如本章所描述的，肿瘤细胞依靠相邻间质微环境获得各种细胞生理支持。这种对异型相互作用的依赖带来了一种新的肿瘤治疗方案，本章介绍了其中一些部分。这种新的治疗方案直接针对异型信号传导而不是肿瘤细胞内信号传导缺陷，从而剥夺肿瘤细胞必需的间质支持。此图示表明一些抗肿瘤治疗方案正在开发或筹划之中。（From J. A. Joyce，Cancer Cell 7：513-520，2005.）

将肿瘤看作“没有治愈的创伤”（wound that do not heal）的观点扩展并回应了我们前面的讨论（11.15 节），其中对慢性炎症在促进肿瘤形成中所起的关键作用已经进行了深入的讨论。炎症和愈伤是相互作用的过程，炎症促进肿瘤形成的机制导致了肿瘤最初的形成，随后被慢性愈伤扩大和精细调节，这似乎可以最好地描述间质发育良好的肿瘤的生物学特性。

这里还有另外一个惊喜。炎症细胞，特别是巨噬细胞，传统上被描述为有效对抗感染物（如细菌）的免疫反应的前锋战士，通过吞噬它们并呈递抗原辅助引导长期的免疫反应，这将在 15 章讲述。现在，我们了解到巨噬细胞在产生有丝分裂原和重塑胞外基质（ECM）的过程中也是关键成分，后者对于肿瘤的侵袭和转移也是至关重要的（第 14 章）。

因此，各种类型的分化细胞的任务已被扩展而变得模糊不清。免疫系统的细胞据称被派遣来保护我们避免感染甚至肿瘤，却通常在肿瘤进展过程扮演活跃的合作者的角色。在小鼠中通过胚系重构（re-engineering）使其免疫系统缺失某种类型的细胞，经常矛盾地造成宿主机体肿瘤生成能力降低。

通常情况下，非常精细的形态发生过程，如愈伤和上皮-间叶转化（EMT），似乎可以解释肿瘤细胞何等聪明，以至可以获得其恶性演进的晚期阶段所需要的复杂细胞表型。现在，这种观念并不让人感到惊奇，因为我们对于肿瘤细胞了解得越多，越能意识到其如何为了满足自身需要而选择并利用了正常的生物学过程。这给本章留下了最后一

个问题：我们是否开始真正了解异型相互作用机制的复杂性，是否还有一个完整的未被发现的信号传导领域及潜伏于肿瘤中的行为程序（behavioral program），像银河的暗物质一样，带给我们惊喜？

重要概念

- 肿瘤是依赖于不同细胞类型间相互通讯的复杂组织。事实上，大部分的肿瘤与其起源的正常组织在组织学上一样复杂。
- 在肿瘤中，细胞类型可以被分为肿瘤上皮细胞和招募的间质细胞，其中包括成纤维细胞、成肌纤维细胞和巨噬细胞，以及参与肿瘤相关血管系统构建的各种细胞类型，特别是内皮细胞、周皮细胞和平滑肌细胞。
- 大部分肿瘤完全依赖所招募的间质细胞获得各种生理支持。这种依赖性只在小部分肿瘤进展到极端恶性的状态时才失去，特别是长在腹水或者胸膜液中的肿瘤细胞。
- 在生物化学水平，这种相互依赖可通过其交换不同类型的促有丝分裂和营养因子来证明。例如，肿瘤细胞或许会释放 PDGF 招募和激活间质细胞，而后者通过释放维持肿瘤细胞的 IGF 来响应。
- 肿瘤相关血管系统的形成即血管新生的过程，是所有大于 0.2mm 的肿瘤生长的一个关键的、限速的决定因素。
- 在肿瘤中，肿瘤相关间质的获得类似于上皮组织的愈伤过程，因此间质的发生依赖于与愈伤过程活化相同的基因表达程序。
- 随着肿瘤的进展，富含成纤维细胞的间质逐步被肌成纤维细胞代替，最终产生富含胶原的、促纤维增生性的间质。
- 肿瘤细胞及炎性细胞，特别是巨噬细胞释放的一些因子，包括 VEGF，参与招募那些直接参加肿瘤新生血管构建的细胞。
- 新生血管代表着新型抗肿瘤药研发的一个引人注目的靶点，即靶细胞是不同类型的参与血管生成的正常间质细胞，而不是不断变化的肿瘤细胞。

思考问题

1. 哪些不同的证据直接证明大部分肿瘤细胞依赖于间质细胞获得各种生理支持？
2. 抗血管生成治疗是否能够（在一些病例中）提高或者抵消（在另外一些病例中）目前的化学治疗的疗效？
3. 巨噬细胞如何促进或者拮抗肿瘤生成？
4. 哪些证据使你相信肿瘤相关间质的产生依赖于与伤口愈合中相同的生物学过程？
5. 哪种生物学力量导致肿瘤相关血管系统在许多方面存在缺陷？
6. 你将采用哪种抗肿瘤药物以剥夺其血供的方式瓦解已形成的肿瘤？
7. 肿瘤细胞可使用哪种生物化学策略减少其对间质支持的依赖？
8. 你能举出癌蛋白如何扰乱肿瘤细胞与其邻近肿瘤相关间质相互作用的例子吗？
9. 你如何确定肿瘤血管系统中的内皮细胞哪部分来源于邻近血管系统的扩张，哪部分来自于循环的内皮前体细胞？

参考读物

Balkwill F & Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.

Bergers G & Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.

Bhowmick NA, Neilson EG & Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.

Bingle L, Brown NJ & Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196, 254–265.

Bissell MJ & Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* 1, 46–54.

Bouck N, Stellmach V & Hsu SC (1996) How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 69, 135–174.

Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395.

Conway EM & Carmeliet P (2003) Cardiovascular biology: signalling silenced. *Nature* 425, 139–141.

Coussens LM & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.

Doljanski F (2004) The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. *Perspect. Biol. Med.* 47, 339–356.

Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1689.

Dvorak HF (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 4368–4380.

Dvorak HF (2003) How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am. J. Pathol.* 162, 1747–1757.

Elenbaas B & Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* 264, 169–184.

Ferrara N (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 795–803.

Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.

Folkman J & Kalluri R (2003) Tumor angiogenesis. In Cancer Medicine, 6th ed (DW Kufe, RE Pollock, RR Weichselbaum et al. eds), pp. 161–194. Hamilton, Ontario: BC Decker.

Gold LI (1999) The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit. Rev. Oncol.* 10, 303–360.

Hanahan D & Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell 86*, 353–364.

Harris AL (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47.

Jain RK (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 271(1), 58–65.

Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9, 685–693.

Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58–62.

Jain RK & Booth MF (2003) What brings pericytes to tumor vessels? *J. Clin. Invest.* 112, 1134–1136.

Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433.

Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776–1784.

Kerbel RS (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505–515.

Kerbel R & Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 727–739.

Leek RD & Harris AL (2002) Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 177–189.

Littlepage LE, Egeblad M and Werb Z (2005) Evolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell* 7,499–500.

McCawley LJ and Matrisian LM (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for the matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 534–540.

McDonald DM & Baluk P. (2002) Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res.* 62, 5381–5385.

McDonald DM & Foss AJ (2001) Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 109–120.

Mueller MM & Fusenig N (2004) Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 839–849.

Nyberg P, Xie L & Kalluri R (2005) Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 65, 3967–3979.

Pepper MS (2001) Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin. Cancer Res.* 7, 462–468.

Rabbani SY, Heissig B, Hattori K & Rafii S (2003) Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol. Med.* 9, 109–117.

Radisky D, Hagios C & Bissell MJ (2001) Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin. Cancer Biol.* 11, 87–95.

Rafii S, Lyden D, Benezra R et al. (2002) Vascular and hematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* 2, 826–835.

Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays* 23, 912–923.

Serini G & Gabbiani G (1999) Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* 250, 273–283.

Sleeman JP (2000) The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 157, 55–81.

Thiery JP (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15, 740–746.

Tlsty T (2001) Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin. Cancer Biol.* 11, 97–104.

Walker RA (2001) The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Res.* 3, 143–145.

Wiseman BS & Werb Z (2002) Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296, 1046–1049.

（王明荣　张　钰　杜小莉　林德晨　刘曙光）

第 14 章　迁出——侵袭和转移

外周血发现与原发肿瘤相同的细胞提示在同一个体内存在多个肿瘤来源的模式。

内科医生，T. R. Ashworth，1869 年

生命起源最重要的时刻是原肠胚的形成而不是个体出生、结婚或死亡之时。

胚胎学家，Lewis Wolpert，1986 年

在肿瘤多阶段演进初期，肿瘤细胞在其起源地无限增殖，通常要经过若干年才形成明显的肿瘤原发病灶。假设 $1cm^3$ 组织中含有 10^9 个以上的细胞，可以想象，当肿瘤明显可见或能被临床医生发现时，肿瘤细胞数量已多达 10^{10}～10^{11} 个以上。

某些器官的原发性肿瘤，尤其是那些生长于胸膜和腹膜间隙的肿瘤，可以长到较大体积而不引起患者任何不适，因为这些腔隙空间具有伸缩性，其内容物具有较强的可塑性。而生长于机体另一些部位的肿瘤，如脑肿瘤，当肿瘤体积相对较小时患者就可产生明显的症状。然而，生长于全身各处的肿瘤当其长到一定大小时都会影响器官的功能，产生程度不同的临床症状。

通常情况下，肿瘤膨胀性生长，挤压周围组织而影响正常组织的生理功能。例如，原发灶肿瘤侵袭邻近正常组织，影响这些组织的生理功能：大的结肠肿瘤会造成消化道堵塞；肝脏和胰腺肿瘤会堵塞胆道；肺部肿瘤往往影响气道功能。

尽管原发性肿瘤非常凶险，但它们只引起 10%左右的肿瘤患者死亡，而大约 90%肿瘤患者最终死于肿瘤的侵袭和转移（图 14.1 和图 2.2）。这种**转移**的形成是肿瘤细胞离开原发病灶，沿着身体的“高速公路”——血管和淋巴管在全身寻找新的部位，重新形成细胞克隆（图 14.2）。乳腺癌细胞通常在身体的多种组织，包括脑、肝、骨和肺等部位种植并形成转移灶。前列腺肿瘤易发生骨转移，而结肠癌易发生肝转移。

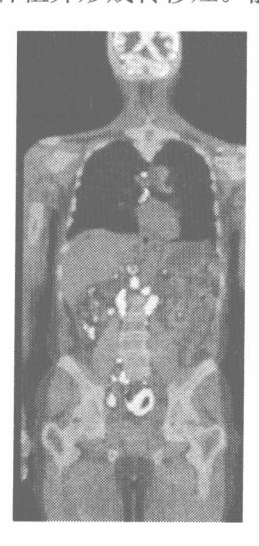


图 14.1　播散的肿瘤　诊断出肿瘤转移常常意味着肿瘤患者被判了死刑，但人们对肿瘤细胞由原发病灶向身体远端器官转移的机制却知之甚少。左图为转移性非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma，NHL）的全身扫描图，这是一张计算机 X 射线断层摄影术（computed X-ray tomography，CT）（灰色和蓝色）和正电子发射断层照相术（positron-emission tomography，PET）扫描的叠加图。PET 反映全身各种组织摄取放射性标记荧光脱氧葡萄糖（radioactively labeled fluoro-deoxyglucose，FDG）的情况（黄色），组织细胞摄取 FDG 越高表明其代谢越活跃。生理情况下，人体大脑代谢很活跃，FDG 摄取量很高。然而，腹部区域出现的许多黄色斑点却代表 NHL 的多发性转移灶。(Courtesy of S. S. Gambhir.)

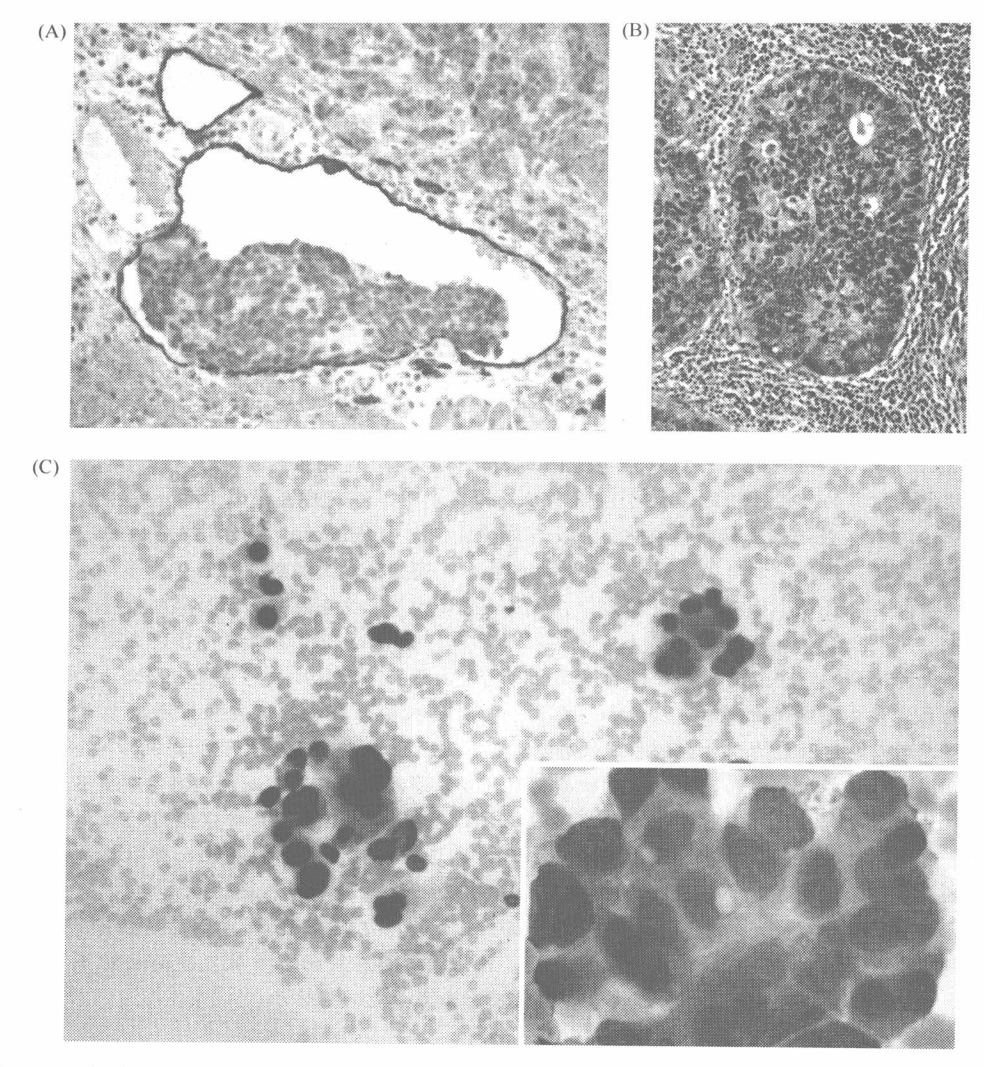


图 14.2 多种组织转移瘤的组织学观察 (A) Rip-Tag 转基因小鼠胰岛细胞瘤（见图 13.36）淋巴管转移标志 VEGF-C（存在于胰岛细胞瘤的淋巴管和血管生成因子）表达增加，可见肿瘤细胞在淋巴管中形成的微小转移细胞团（深粉红色）和排列成管状的淋巴管内皮细胞（棕色）。(B) 与乳腺引流淋巴管相连的淋巴结中的乳腺癌微小转移灶。可见转移灶具有明确的组织结构，包括导管和基质，这是许多原发性乳腺癌的组织学特性，在周围淋巴管中可见许多淋巴细胞（深色的细胞核）。(C) 骨髓中的转移癌细胞。通过 Wright-Giemsa 特殊免疫组织化学染色，将上皮来源的转移癌细胞染成蓝色而有别于间叶细胞来源的骨髓细胞。(A, from S. J. Mandriota, L. Jussila, M. Jeltsch et al., EMBO J. 20: 672-682, 2001; B, courtesy of T. A. Ince; C, from A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

肿瘤细胞的播散是肿瘤发展中最危险的过程，当肿瘤细胞在远处器官形成克隆时，往往会导致机体产生严重的后果。女性位于乳腺的肿瘤一般不会影响生理功能，几乎所有局限于乳腺的原发性乳腺癌都不会威胁生命。然而，乳腺癌发生骨转移时，会造成骨组织的局部侵蚀，引发剧烈疼痛以及骨质溶解。若发生脑转移将会迅速损伤中枢神经系

统功能，发生肺或是肝转移同样也会威胁生命，因为这些器官具有重要的生理功能。

某些组织器官易于发生肿瘤转移，而另一些组织几乎不发生肿瘤转移，目前原因还不十分清楚。当发现原发性黑色素瘤侵袭进入皮下组织时，癌细胞播散至机体远端器官几乎已成定局。相反，皮肤鳞状细胞癌和原发于脑神经胶质细胞的脑星状细胞瘤则很少发生转移。

事实上多种人类肿瘤，当发现原发肿瘤病灶时，瘤细胞已经发生了全身性播散。诊断初期，播散的肿瘤细胞仅形成微小细胞克隆——微小转移灶，通常查不到肿瘤转移。肿瘤转移的这些行为引出本章和第 16 章的讨论问题：原发肿瘤的特点（信息栏 14.1）可以揭示肿瘤细胞是否发生了全身性播散，当手术切除原发瘤很长时间后，体内播散的瘤细胞是否最终还会形成致命的肿瘤转移灶？

信息栏 14.1　肿瘤大小与疾病预后关系尚不清楚　通常粗略测量原发瘤大小与肿瘤在机体远端发生转移的可能性相关。如图 14.3 所示，研究表明，诊断时直径小于 1cm 的原发性乳腺癌妇女中，约 22%最终形成转移性疾病。相反，那些直径大于 8cm 的原发性乳腺癌妇女，约 77%发生了肿瘤转移。此外，该研究还表明，在肿瘤进展中，通常体积大的肿瘤经历了更多的遗传学和表观遗传学改变。直径小于 1cm 的乳腺癌中，仅 4%携带 p53 等位基因突变，而那些直径大于 3cm 的肿瘤中，约 42%具有 p53 突变。从上述观察结果可以得出结论：肿瘤细胞转移能力是在原发肿瘤由小到大的进展过程中相对晚期获得的，而且可能是由于 p53 功能缺失造成的。事实上，这些统计数字的真实意义很难评价，但可以做如下解释。①肿瘤细胞转移特性只在原发肿瘤生长的相对晚期获得，因而，这种能力限于大的原发性肿瘤内的细胞。②原发瘤不论大小，其中的单个肿瘤细胞具有相同的转移能力，然而，体积大的肿瘤具有更多的瘤细胞，在单位时间内可分配更多的转移细胞到机体的其他部位。③在肿瘤多步骤发展过程中，原发瘤中具有较强增殖能力的细胞同样也表现出一种相关的特性——转移的能力。这些肿瘤细胞与增殖较慢的细胞相比，可以更快地长成体积大的原发瘤。同时，这些快速增殖的细胞也成为广泛播散转移灶的来源。

恶性肿瘤中出现突变的基因也同样存在争议：在大的原发肿瘤中 p53 基因的高频突变并不意味着这种突变是在原发瘤发展晚期获得的。相反，肿瘤细胞群在肿瘤多步骤发展的相对早期即获得 p53 等位基因突变将会促进肿瘤加速生长，在诊断时形成更大的瘤体积。

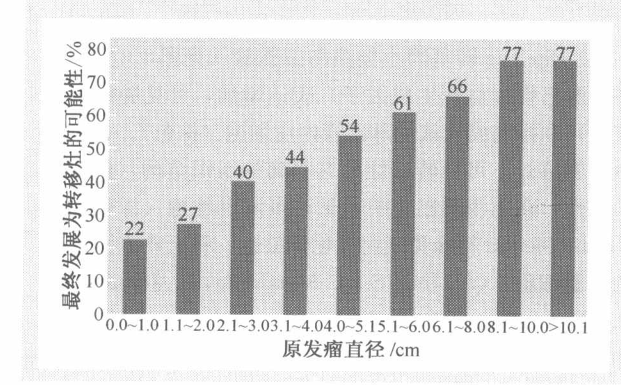


图 14.3　原发肿瘤的大小与转移风险　这张条形图说明随着初次诊断时原发性乳腺癌直径的增加，肿瘤在患者体内发生远端转移的可能性也随之增加。这项研究比较了 1589 名原发性乳腺癌患者初诊时肿瘤的大小，并在治疗后进行了长达 46 年的随访，观察和记录了原发肿瘤最终发生远端肉眼可见转移灶的百分比。(From R. Heimann and S. Hellman, J. Clin. Oncol. 16：2686-2692，1998.)

本章讲述肿瘤发展过程中涉及的侵袭性问题，依赖于肿瘤细胞本身以及相关基质复杂的生物化学变化。如前几章所述，肿瘤形成的主要步骤已经非常清楚。然而，对肿瘤侵袭转移的机制目前认识依然十分有限，这就是为什么这些在肿瘤进展晚期出现的侵袭转移机制是肿瘤发病机制中主要悬而未决的问题。

14.1 肿瘤细胞由原发瘤向潜在的转移灶迁移依赖于一系列复杂的生物学步骤

大多数（>80%）威胁生命的恶性肿瘤是发源于上皮组织的癌症，因而本章所涉及的多数肿瘤主要是癌症。需要说明的是，来源于其他组织的肿瘤，如结缔组织和神经组织的肿瘤也具有相似的侵袭转移方式。甚至某些造血系统肿瘤，特别是淋巴瘤，也同样具有局限化的早期阶段和播散至远端组织器官的晚期阶段（图 14.1）。这一系列复杂的步骤被称为“侵袭-转移级联反应”（图 14.4）。

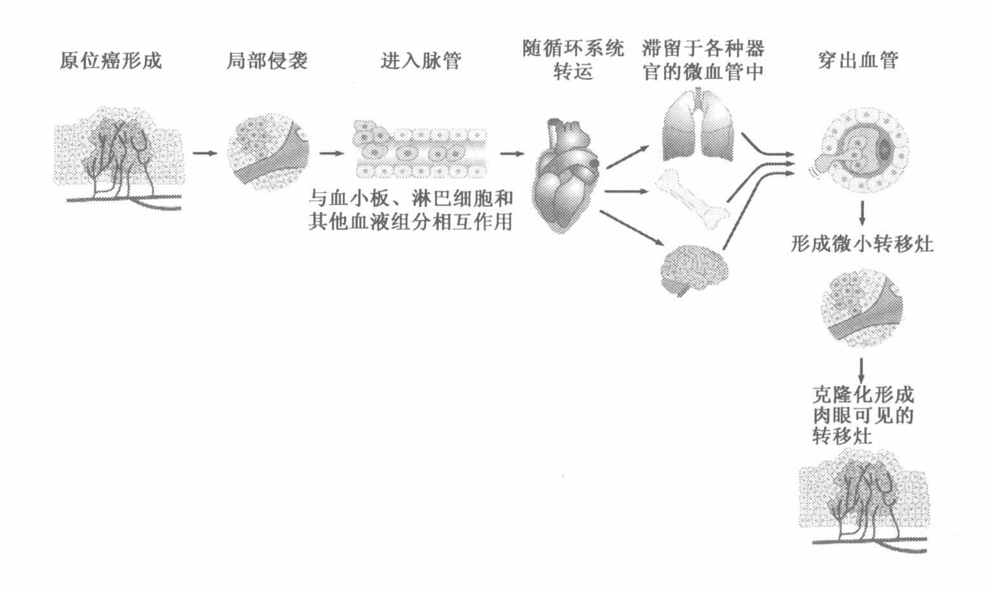


图 14.4 侵袭-转移级联反应 这里将侵袭-转移级联反应的全部过程概括为 6 个独立的步骤：起始阶段，局部侵袭使原位癌细胞突破基底膜；随后，肿瘤细胞进入毛细淋巴管或毛细血管，被转运到机体远端部位；瘤细胞滞留并穿出毛细淋巴管或毛细血管管壁，瘤细胞在转移部位形成隐匿的微小转移灶；一些微小转移灶在转移部位获得形成微小克隆的能力，形成肉眼可见的转移瘤；最终，肿瘤细胞克隆化，这是所有步骤中效率最低的一步。成功完成全部级联步骤的可能性很小，这就是为什么单个肿瘤细胞离开原发瘤后，很难成功地形成远端肉眼可见的转移灶的原因。（Adapted from I. J. Fidler，Nat. Rev. Cancer 3：453-458，2003.）

这里主要集中讨论癌症的侵袭转移问题，需要回顾以前讨论过的一些癌症及其起源的上皮组织（见 2.2 节和 13.1 节）。简而言之，多数上皮组织的结构都是按照建筑学原理构建的：在大多数情况下，相对薄的上皮细胞层位于复杂的基质层的上方，两层之间被一种叫做基底膜的特殊细胞外基质（extracellular matrix，ECM）所分隔（见图 2.3 和图 13.5）。这一蛋白质网络是由上皮细胞和基质细胞分泌的蛋白共同构建的。

从定义上来讲，来源于基底膜上皮侧并仅局限于这一侧的肿瘤，称为良性肿瘤。然而迟早，一些肿瘤细胞获得穿透基底膜的能力，单个或是一群肿瘤细胞开始侵入邻近的

基质（图 14.5）。这种肿瘤细胞团块被重新定义为恶性肿瘤。事实上，正如前面章节所述，许多病理学家和外科医生习惯用“癌症”（cancer）代表来源于上皮并获得侵袭能力的肿瘤。可以肯定的是，侵袭性肿瘤细胞造成基底膜分解，破坏了阻碍肿瘤细胞群进一步扩张的重要屏障。同时，如前一章所述，各种基底膜成分的降解，使入侵的细胞获得促进细胞生长和存活的因子，而在正常情况下，这些因子与特化的细胞外基质黏附在一起而难以解离。

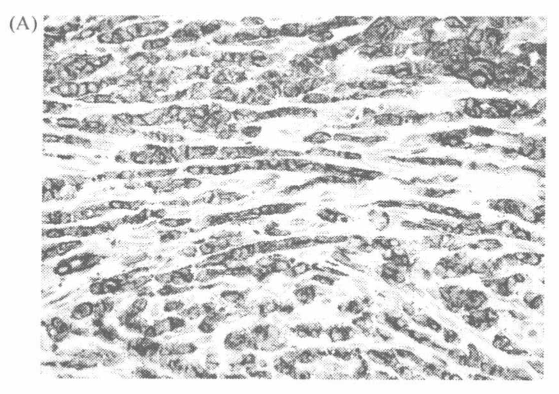
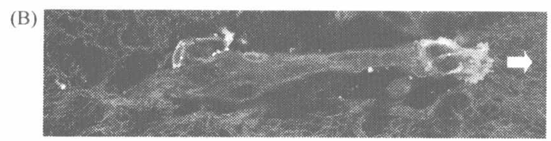
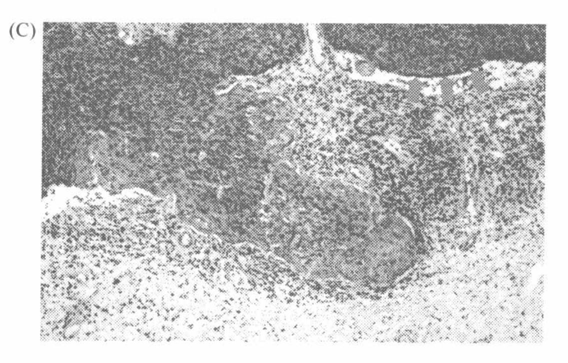
(A)

(B)

(C)


图 14.5 侵袭模式 (A) 侵袭的乳腺小叶癌细胞（棕色）离开原发瘤，侵袭邻近细胞基质，形成一个接一个排列的形态。(B) 激光共聚焦显微镜下呈现的黑色素瘤细胞以 5～10 个细胞的密集细胞团的典型方式侵袭邻近组织基质（蓝色）。像正常的黑色素细胞一样，细胞间经 E-钙黏素（红色）介导的紧密连接相连，基质中可见被肿瘤细胞降解形成大的间隙（黑色）。在肿瘤侵袭前缘（白色箭头所示），黑色素瘤细胞表达 131 整联蛋白分子（绿色），使其可与前方细胞外基质紧密接触。(C) 这种侵袭进一步可在子宫颈鳞状细胞癌中呈现。成百个肿瘤细胞（粉色，棕色）呈手指状或舌状穿透基底膜向基质侵袭。基质中具有特征性的基质成纤维细胞和炎症细胞（暗绿色）。深棕色的基底膜沿水平方向（右上方粉红色箭头）将肿瘤细胞（上方）与基质细胞（下方）分开，除一个毛细血管和侵袭性肿瘤细胞舌外，基底膜呈连续性分布。(A, courtesy of J. Jonkers; B, from P. Friedl, Y. Hegerfeldt and M. Tusch, Int. J. Dev. Biol. 48: 441-449, 2004; C, courtesy of T. A. Ince.)

肿瘤细胞在突破基底膜前，常通过产生促进血管生长因子通过多孔屏障到达基质内的内皮细胞刺激基底膜基质侧血管生成（图 13.38）。然而，穿透基底膜非常有利于肿瘤细胞进行后续的侵袭-转移级联反应。一旦处于基质环境中，肿瘤细胞可以直接从血管和淋巴管入口进入血管和淋巴管（见图 13.40），而在正常情况下，这些血管和淋巴管仅分布于基底膜的基质面（信息栏 14.2）。与毛细血管的紧密接触使肿瘤细胞易于获得血液中携带的营养物质和氧气，此外，这些肿瘤细胞的侵袭特性使其可以突破管壁进入血管和淋巴管，这一侵入血管的过程被命名为**内渗**（intravasation）。

信息栏 14.2　肿瘤细胞通常以细胞群方式侵袭　这里和其他章节中描述的肿瘤细胞侵袭都是指单一肿瘤细胞离开原发瘤，进入邻近组织基质，最终入侵血管的过程。事实上某些肿瘤，如乳腺侵袭性小叶癌（图 14.5A），单个瘤细胞一个接一个地通过破坏邻近基质所形成的通道离开原发灶（又称为"印第安队列"）。但是，肿瘤细胞多以密集细胞团（如同高度组织化的群体）的典型方式侵袭邻近组织基质（图 14.5C）。在以下章节中会讨论，与基质直接接触的肿瘤细胞如何为随后入侵的瘤细胞铺平道路。然而，当侵袭细胞前沿接近血管系统肿瘤细胞开始内渗时，迟早需要单个瘤细胞或一小团瘤细胞依靠自己的能力进入循环系统。

一旦肿瘤细胞进入血管或是淋巴管的管腔，单个瘤细胞会随血流或是淋巴液到达身体其他部位，这种长途迁徙充满危险。像正常细胞一样，肿瘤细胞也需要锚定在固相支持物上，没有依附迁移的细胞将很快发生失巢凋亡（anoikis）。这种情况下，当细胞与固相支持物（如细胞外基质）解离便会引起细胞凋亡（5.8 节和 9.13 节）。与原发瘤一样，这些发生侵袭的先驱者细胞也需要各种基质的支持，但瘤细胞入侵的环境最初缺乏这种基质。值得注意的是，基质可以通过多种途径，如提供促进细胞有丝分裂和细胞存活的营养因子来帮助入侵的瘤细胞生长。

血液对入侵的肿瘤细胞来说是一种不良的生存环境，血液循环（尤其在小血管中）形成的强剪切力，会导致循环中的肿瘤细胞破裂。基于小鼠转移瘤模型的实验表明，循环中的肿瘤细胞可以募集周围的血小板，这样可以保护它们快速通过湍急的循环血流进入组织（补充材料 27 ◎）。

如果转移细胞能从最初的危险中存活下来进入大静脉，它们会随血流通过心脏，很有可能在最先流过的肺部毛细血管着床停留（图 14.6）。与红细胞、白细胞等血细胞不同，大的肿瘤细胞难以通过多数内径较小的毛细血管。毛细血管内径通常在 3～8μm，易于血细胞通行。例如，红细胞直径约 7μm，而且可以变形，因而很容易通过毛细血管（图 14.7）。但是，多数肿瘤细胞直径大于 20μm 并且不易变形。如果血液中的肿瘤细胞被血小板包被（补充材料 27 ◎）其实际直径更大，易于滞留在内径比毛细血管更大的血管，如细动脉中。

一旦瘤细胞滞留在肺，一些转移的肿瘤细胞将尝试建立转移灶。然而，多种人类肿瘤常常不是在肺，而是在身体其他部位形成转移灶。这表明肿瘤细胞可以从肺部毛细血管床逃逸，抵达身体远端部位并形成转移灶，相关机制尚不清楚。从一些实验观察到，滞留于肺部毛细血管的肿瘤细胞可以缩减胞质，在不影响存活的情况下使细胞体积大为缩小。一旦"瘦身"成功，这些细胞就可以成功地通过肺部狭窄的毛细血管。另一种可能的解释是，循环肿瘤细胞可以有效利用动、静脉间具有较大内径的交通支，绕行于动脉和静脉循环系统，避免滞留于肺脏等多个器官的细小毛细血管。

肿瘤细胞经肺部到达动脉循环后（图 14.6），循环中的肿瘤细胞可以播散至全身各个组织。实验表明，利用细胞表面特殊受体，如整联蛋白，肿瘤细胞可以黏附在特定组织的细动脉和毛细血管壁上。更多实验提示，肿瘤细胞在小血管中单纯的物理性滞留，如前所述肺中的情况，是循环肿瘤细胞在组织中的第一个立足点。

肿瘤细胞一旦在各种组织的血管中停留，就必须尽早离开血管进入周围组织，这一步骤叫**外渗**（extravasation）。外渗依赖于肿瘤细胞与所滞留血管管壁间复杂的相互作

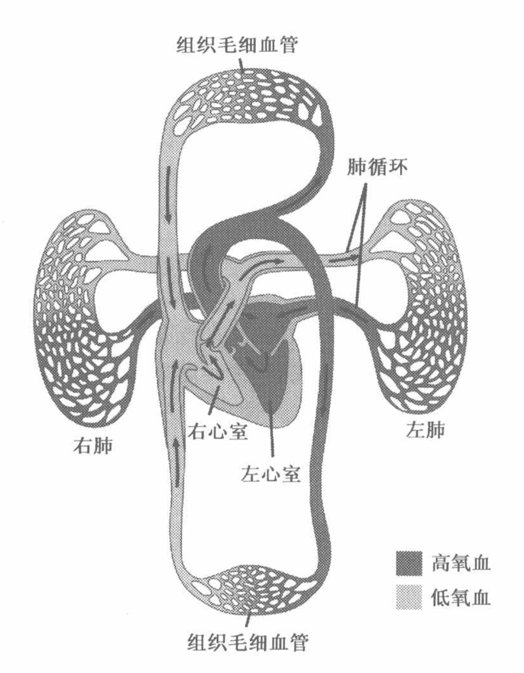


图 14.6　全身血液循环主要通路　哺乳动物循环系统示意图中显示，伴随离开组织的静脉血（蓝色）肿瘤细胞离开原发瘤内渗进入血液循环，首先必须通过右心室，经肺脏进入左心室并由此进入动脉循环。因为肺循环需要经过肺部毛细血管，因此几乎所有进入静脉循环的转移性肿瘤细胞都会迅速在肺部毛细血管床滞留。（From：P. H. Raven，G. B. Johnson，S. Singer et al.，Biology，7th ed. New York：McGraw-Hill，2005.）

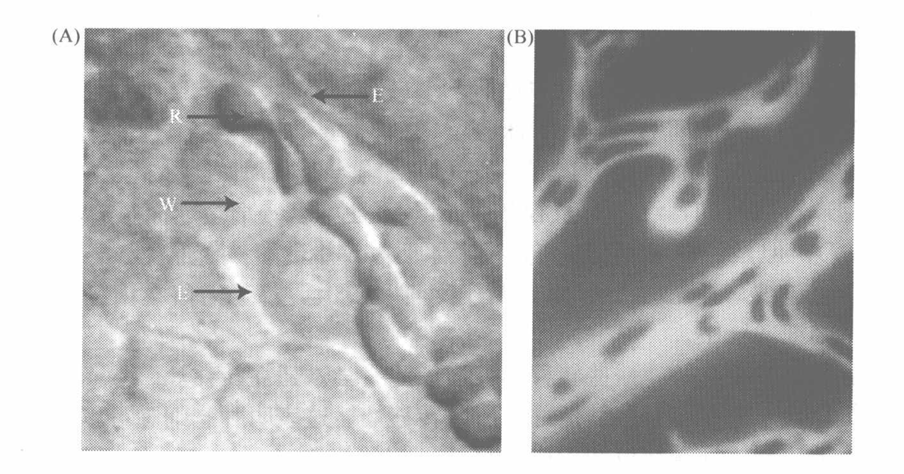


图 14.7　肿瘤细胞通过毛细血管　（A）活体成像显微镜下观察毛细血管的两层内皮细胞壁（E）、红细胞（R）和白细胞（W）。这些细胞体积小，可变形，它们可以通过毛细血管而不会滞留。（B）活体成像荧光显微镜下观察这些血管的直径稍大于毛细血管。其中，绿色荧光显示血浆，红色荧光为红细胞，可见红细胞发生了明显的变形。由于肿瘤细胞的直径比红细胞大 2 倍以上，而且不易变形，因而很难通过狭窄的管腔，如毛细血管管腔。

用，而肿瘤细胞可以采用多种方式迁出血管。瘤细胞可以在血管腔内增殖，产生小的肿瘤，瘤细胞持续增殖最终破坏邻近血管壁（图 14.8 和图 14.9）。肿瘤细胞向周围推开血管内皮、外膜和平滑肌细胞，而这些细胞先前可将周围组织与血管腔分开。同时，肿

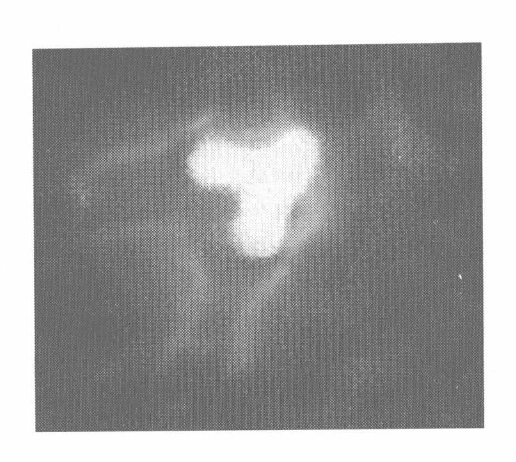


图 14.8 生长于微血管腔内的肿瘤细胞 激光共聚焦扫描显微镜显示表达绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的大鼠纤维肉瘤细胞在细动脉腔内增殖。用连接低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）的染料标记细动脉壁（红色），LDL 结合在内皮细胞表面的 LDL 受体上。单个肿瘤细胞进入静脉循环第 5 天后，在细动脉腔中观察到肿瘤细胞团。(Courtesy of R. J. Muschel.)

瘤细胞还可以直接穿出血管壁。这种能力和其前体细胞离开原发瘤，侵入血管具有相同的生物化学和细胞生物学机制（信息栏 14.3）。

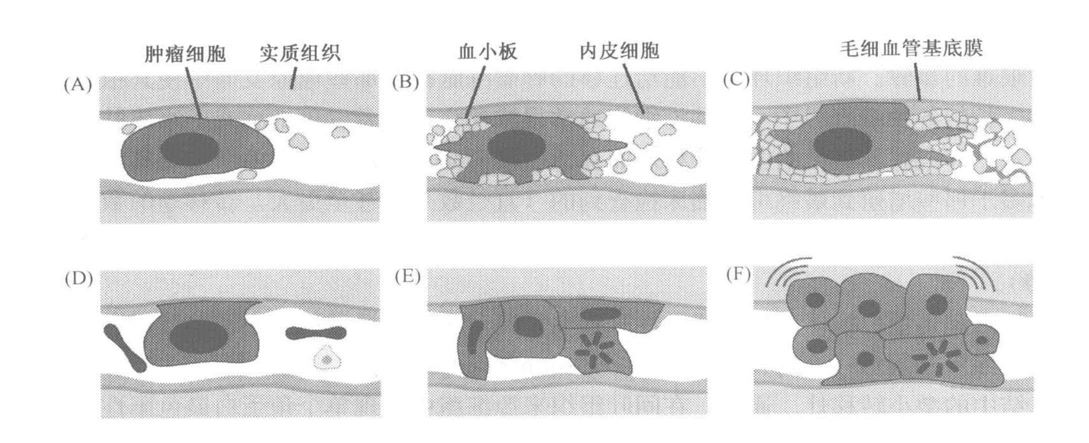


图 14.9 肿瘤细胞外渗的步骤 电子显微镜观察将肺癌细胞注入小鼠静脉循环的实验提示，循环肿瘤细胞外渗过程包括以下步骤：(A) 转移的肿瘤细胞（胞质呈浅棕色，胞核为深棕色）被物理性滞留于毛细血管内；(B) 几分钟内大量血小板（蓝色）黏附于肿瘤细胞上形成微血栓，其中许多血小板还没有发生脱颗粒并释放生长因子、蛋白酶等物质；(C) 肿瘤细胞将毛细血管一侧壁上的内皮细胞（绿色）推开，而直接触及下层毛细血管基底膜；(D) 1 天内，微血栓被血液中的蛋白酶降解，这些蛋白酶通常专门溶解血凝块；(E) 肿瘤细胞开始向血管腔内增殖；(F) 几天或更短时间内，肿瘤细胞破坏毛细血管基底膜，侵袭到周围的实质组织（灰色区域）。这一过程中，只在肿瘤细胞被滞留于毛细血管后才形成微血栓。(From J. D. Crissman, J. S. Hatfield, D. G. Menter et al., Cancer Res. 48：4065-4072，1988.)

信息栏 14.3　肿瘤细胞是笨拙的脱身术艺术家　血液中的白细胞离开循环系统进入周围的实质组织是个复杂的过程。当它们受到特定炎性信号刺激时，如存在感染源，白细胞必须迁徙进入实质组织。通过一系列称为血细胞渗出的步骤，白细胞诱导毛细血管后小静脉的内皮细胞收缩，打开通往组织的入口。从黏附在内皮细胞壁到进入实质组织，整个过程不超过 1min，但却是一个涉及多种生物化学和细胞生物学改变的精密调控过程！

相反，多数转移性肿瘤细胞没有血细胞渗出所需的受体以及相应的生化反应机制。因此，肿瘤细胞若要穿出毛细血管或稍大些的血管壁，需要额外努力。这个过程不能一蹴而就，多数肿瘤细胞需要数小时，甚至 1 天的时间降解血管内皮。此外，在形成微血栓的过程中产生的凝血酶可以非常有效地切割内皮细胞与下层基底膜间的黏附蛋白（补充材料 27 ◎），从而使内皮细胞脱离微血栓，使侵袭的肿瘤细胞及其产生的蛋白酶直接作用于暴露的毛细血管基底膜。

14.2　克隆形成是侵袭转移级联反应中最复杂和具有挑战性的步骤

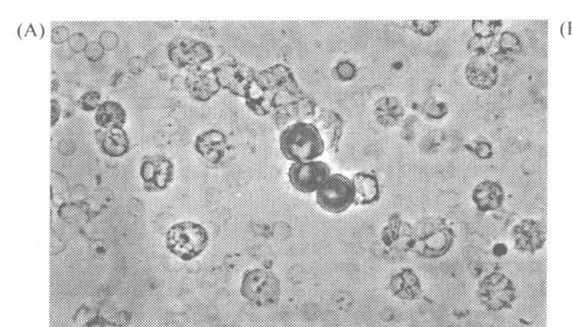
一旦转移的肿瘤细胞到达实质组织，它们将开始在新的环境中增殖并形成肿瘤团块，这个过程称为**克隆形成**（colonization）。也许这是侵袭转移级联反应中最富挑战性和最艰难的步骤。新组织环境不能给迁移的肿瘤细胞提供那些像原发瘤中使其祖先细胞旺盛生长的各种细胞因子，转移瘤细胞通常很快死亡，或者以单细胞或一小簇肿瘤细胞的形式，即肉眼不可见的微小转移灶而存活一段时间。肿瘤患者体内微小转移灶的数量远远多于那些增殖到最终可为临床检查到的（直径数毫米甚至更大）转移瘤的数目。这些微小转移灶广泛分布于肿瘤患者的组织中，有时会引起灾难性的后果（补充材料 28 ◎）。

抗细胞角蛋白抗体对检测原发性肿瘤在骨髓和血液中播散的微小转移灶很有用，而抗上皮细胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule，EpCAM）抗体通常用于检测淋巴结中的微小转移灶。通常，在间叶组织来源细胞中出现单个角蛋白染色阳性的上皮来源细胞，是发生肿瘤播散转移的明确信号。目前，利用抗角蛋白特异性抗体，在显微镜下可以从血液、骨髓和淋巴结中多达 10^5 甚至 10^6 个间叶来源细胞中检测到一个转移的肿瘤细胞（图 14.10）。

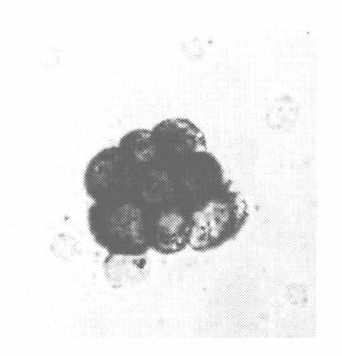
肿瘤细胞侵袭转移级联反应的许多步骤是低效的，单个细胞能够完成所有步骤形成转移灶的比例非常低。例如，携带约 1g 原发瘤（约 10^9 个细胞）的小鼠，循环系统中每天有多达百万的肿瘤细胞，然而形成的转移灶却寥寥无几。

肿瘤细胞很少能成功地形成转移灶的现象被称为无效转移（metastatic inefficiency），这是侵袭转移级联反应过程中一系列无效步骤顺序叠加的最终结果。实验表明，侵袭转移细胞在级联过程的早期步骤中成功率很高，但最后一步的成功概率很低，克隆形成是整个级联过程的限速步骤。因此，当转移细胞及其后代最终能够形成临床上可检测到的肿块前，相当一段时间里已经有大量的微小转移灶遍布全身各器官组织（信息栏 14.4）。

(A)



(B)



(C)

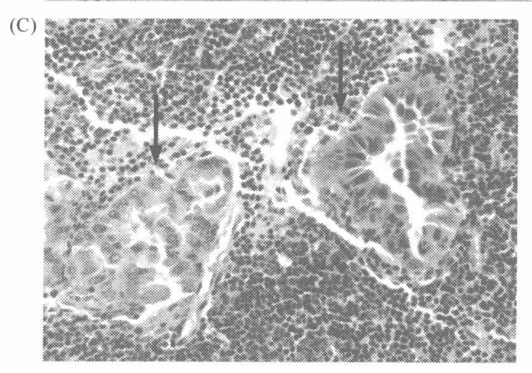


图 14.10　检查淋巴结或骨髓中的微小转移灶　(A) 检测转移到骨髓中的癌细胞，一般从骨盆的髂前上棘处抽取骨髓。图中所示，抗细胞角蛋白抗体的免疫组化染色，从1例结肠癌患者骨髓中检测到多个肿瘤细胞的微小转移灶。(B) 对乳腺癌患者骨髓检查也观测到与上述结果一致的图像。如低倍镜下8个乳腺癌细胞形成一个微小转移灶。(C) 淋巴结中也存在微小转移灶，与其周围淋巴细胞形成鲜明对比。箭头所示为淋巴结中两个小鼠肺腺癌细胞的转移灶，其中右侧的微小转移灶已经形成了导管样结构。(A, courtesy of I. Funke and G. Riethmüller; B, from S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al., N. Engl. J. Med. 342: 525-533, 2000; C, courtesy of K. P. Olive and T. Jacks.)

信息栏 14.4　遗传分析显示肿瘤转移能力的进化可以来自原发瘤之外　大约30%的乳腺癌、前列腺癌和结肠癌患者在手术切除原发瘤后，仍然能在骨髓、淋巴结或血液中检测到微小转移灶，因而认为这些人患有“微小残留病”(minimal residual disease)。对微小转移灶的遗传分析提示，此时转移灶之间具有遗传异质性。然而，数年后当肿瘤复发、转移瘤快速增长时，患者体内的单细胞微小转移灶间却在遗传上非常相似（图 14.11A）。

这揭示了在肿瘤发展过程中，获得克隆形成能力与向远处器官播散转移的能力是彼此独立的。最初，遗传背景不同的肿瘤细胞从原发瘤种植播散至全身，但它们很少能成功地形成肉眼可见的转移灶，因为它们并不具有克隆形成的能力。但经过一段时间后，身体一些部位的微小转移灶细胞发生了遗传进化，产生了具有克隆形成能力的细胞克隆。随着克隆生长扩张，可以在全身各处种植瘤细胞，由此形成新一轮的播散转移。具有克隆形成能力的单个肿瘤细胞很快在患者骨髓中形成大量的单细胞微小转移灶。因为它们来源于同一细胞克隆群体，所以它们的遗传学背景非常相似。重要的是，由于新的微小转移灶中的细胞都继承了克隆形成的能力，有些很快形成肉眼可见的克隆，严重威胁肿瘤患者的生命。这种模式（图 14.11B）说明，肿瘤细胞向高度恶性的进化常常发生在远离原发瘤的部位（图 14.11B 中的示意图尚未经过大量统计学资料的证实）。

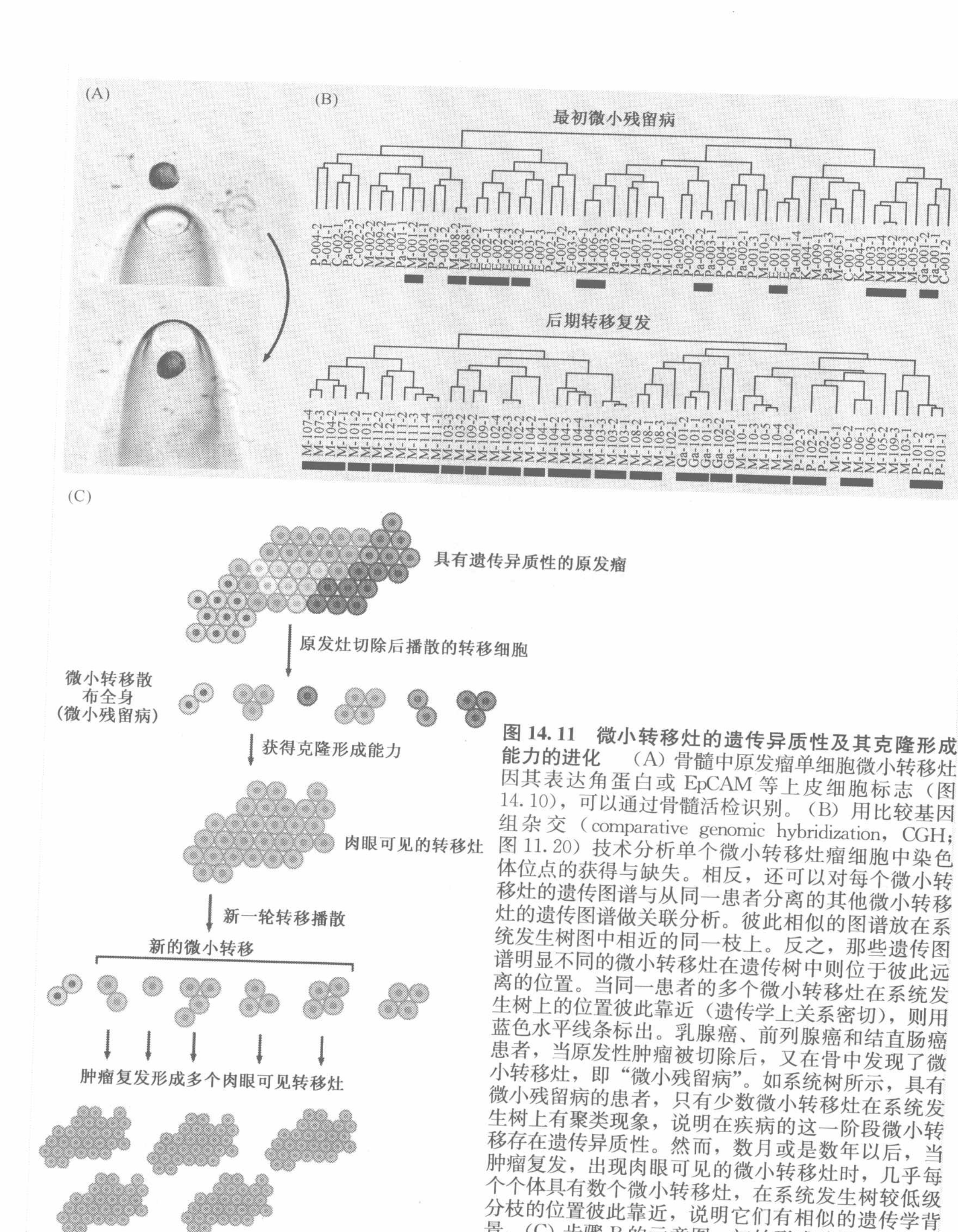


图 14.11　微小转移灶的遗传异质性及其克隆形成能力的进化　(A) 骨髓中原发瘤单细胞微小转移灶因其表达角蛋白或 EpCAM 等上皮细胞标志（图 14.10），可以通过骨髓活检识别。(B) 用比较基因组杂交（comparative genomic hybridization，CGH；图 11.20）技术分析单个微小转移灶瘤细胞中染色体位点的获得与缺失。相反，还可以对每个微小转移灶的遗传图谱与从同一患者分离的其他微小转移灶的遗传图谱做关联分析。彼此相似的图谱放在系统发生树图中相近的同一枝上。反之，那些遗传图谱明显不同的微小转移灶在遗传树中则位于彼此远离的位置。当同一患者的多个微小转移灶在系统发生树上的位置彼此靠近（遗传学上关系密切），则用蓝色水平线条标出。乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌患者，当原发性肿瘤被切除后，又在骨中发现了微小转移灶，即"微小残留病"。如系统树所示，具有微小残留病的患者，只有少数微小转移灶在系统发生树上有聚类现象，说明在疾病的这一阶段微小转移存在遗传异质性。然而，数月或是数年以后，当肿瘤复发，出现肉眼可见的微小转移灶时，几乎每个个体具有数个微小转移灶，在系统发生树较低级分枝的位置彼此靠近，说明它们有相似的遗传学背景。(C) 步骤 B 的示意图：初始形成阶段，原发性肿瘤细胞群具有遗传异质性（图 11.18），它在肿瘤患者体内播散形成的微小转移灶也同样具有异质性。手术切除了原发瘤后，留下微小转移灶，形成"微小残留疾病"。数年后，在身体某个部位这些微小转移灶中的某个细胞克隆（蓝色）获得了克隆形成能力，形成肉眼可见的转移瘤，它们是随后在身体各处形成新的转移播散级联反应的细胞来源。由于这些新播散的细胞具有相同的来源，所以它们形成的微小转移灶具有相似的遗传背景。而且，每个继发性微小转移灶的细胞都具有克隆形成的能力（由于它们都来源于已获得这种能力的转移瘤），许多这样的微小转移灶可以很快长成肉眼可见和（或）临床上检测得到的转移瘤，最终导致疾病的复发。(A and B, from C. A. Klein, T. J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler et al., Lancet 360：683-689，2002.)

一些实验研究提供了存在长期处于生长静止状态的隐匿性微小转移灶的证据。将活的肿瘤细胞短暂地暴露于荧光标记的微粒，这种微粒可以在细胞内存在很长时间而不影响细胞的生存能力。标记以后，其在细胞内的浓度，即染料颗粒的荧光强度，会随着每次细胞分裂减少1倍。这样，一段时间后，细胞内残存的荧光强度可以使研究者估计，从标记伊始细胞经历了多少次分裂。

当这种染料标记的肿瘤细胞从门静脉进入小鼠肝脏时，会形成大量的单细胞微小转移灶。11周后，取出肝脏中的这些肿瘤细胞，其中许多细胞仍具有起始标记量的荧光强度（图14.12），说明它们到达肝脏后没有进行细胞分裂。重要的是，取出的这些肿瘤细胞在体外仍具有增殖能力，当重新植入其他小鼠后可以形成新的肿瘤。

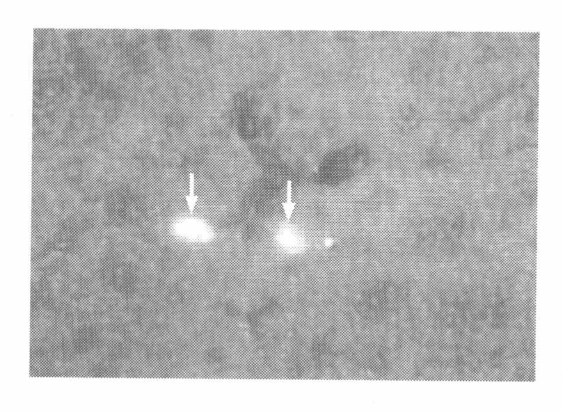


图14.12 单个隐匿性的肿瘤细胞可以在肝脏存在数周 成瘤小鼠的乳腺癌细胞通过摄取荧光染料标记的苯乙烯纳米颗粒（直径为48nm）而被标记。随后这些细胞被注射入肠系膜静脉，通过门经脉进入肝脏。11周后，肝脏中仍然可以检测到肿瘤细胞（白色箭头）。重要的是，许多细胞的荧光强度与初始标记的细胞相比，没有发生明显变化，这说明细胞在标记后没有发生分裂。通过分离以及体外培养，发现这些细胞的后代具有成瘤性。例如，将其注入小鼠乳腺脂肪垫后可以形成肿瘤。而且，这些休眠的肿瘤细胞对化疗药物完全耐药，但化疗可以使同一小鼠中转移瘤的体积减小75%。(From G.N. Naumov, I.C. MacDonald, P.M. Weinmeister et al., Cancer Res. 62：2162-2168，2002.)

上述实验表明，转移的肿瘤细胞在其他组织中可以不分裂，以休眠的状态存活很长一段时间（注意，还存在另一类型微小转移灶，这些播散的肿瘤细胞可以在其他组织增殖，形成很小的克隆，但是，它们的体积不会增大，因为在这一细胞团中，增殖与凋亡的速率达到了平衡，或是因为这些细胞不能促进血管生成，见13.7节）。无论如何，微小转移灶的存在是一种潜在的威胁，因为它们通常遍布全身，在肿瘤被认为治愈后的几年又会再次暴发。

总的来说，侵袭转移级联反应的多步骤过程，与原发瘤形成相比，具有许多不同的生物学改变。这两节中描述的级联反应的复杂性所引发的问题，将在下面的章节中继续讨论，比如怎样知道肿瘤细胞发生了转移？在肿瘤发生过程中，这一级联反应的每一步是否都需要激活特定的基因？侵袭转移的每一步是否都由一个主要的控制基因或是一组这样的基因所决定？

我们同样需要面临一个简单但是非常重要的问题：是否高度恶性的细胞携带有专门诱导侵袭和转移的突变基因？或者说肿瘤进展的晚期阶段是否依赖于一些常规因子的激活，如在本书中重复出现的某些特定的癌基因或是抑癌基因？

14.3 上皮间叶转变及其伴随的E-钙黏素表达缺失使肿瘤细胞发生侵袭

发生转移的第一步局限性侵袭，需要原发瘤的肿瘤细胞发生许多表型改变。如前所

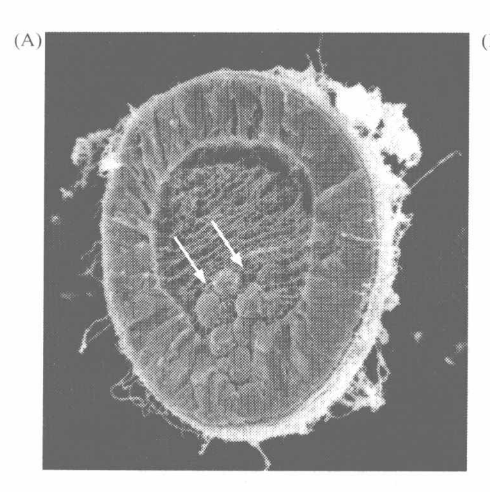
述，这里主要讨论上皮组织来源的肿瘤。正常上皮组织的多层细胞结构不利于恶性肿瘤细胞的运动和侵袭。然而，许多原发瘤仍保持良好的上皮组织多层细胞结构，但是其总体的布局与正常上皮存在差异（见图 2.6）。

为获得运动和侵袭能力，肿瘤细胞必须丢失许多上皮细胞表型，使上皮层发生巨大改变——上皮间叶转变（epithelial-mesenchymal transition，EMT）。这一概念在创伤愈合部分（13.3 节）曾经提到过。EMT 涉及丢失上皮细胞典型形态和基因表达模式，以及获得间叶细胞形态和基因转录特性。上皮细胞表型发生改变对于创伤后重建上皮细胞层十分必要（图 13.13C）。在胚胎发育过程中，EMT 普遍存在于某些形态发生和组织重建阶段，依赖各种类型的上皮细胞发生 EMT（表 14.1）。很有可能，但却很难证实的是，所有类型的肿瘤细胞必须经历部分或完全的 EMT 才能获得运动和侵袭的能力。

表 14.1　小鼠胚胎发育过程中的 EMT 现象

过程	转换	
	从……	到……
原肠胚形成	外胚层	中胚层
心脏瓣膜前间叶细胞	内胚层	动脉和心室隔膜
神经嵴细胞	神经板	能形成骨骼、肌肉和外周神经系统的神经嵴细胞
体节发生	体节壁	巩节
上颚形成	口腔外胚层	间叶细胞
副中肾管退化	副中肾管	间叶细胞

(A)



(B)

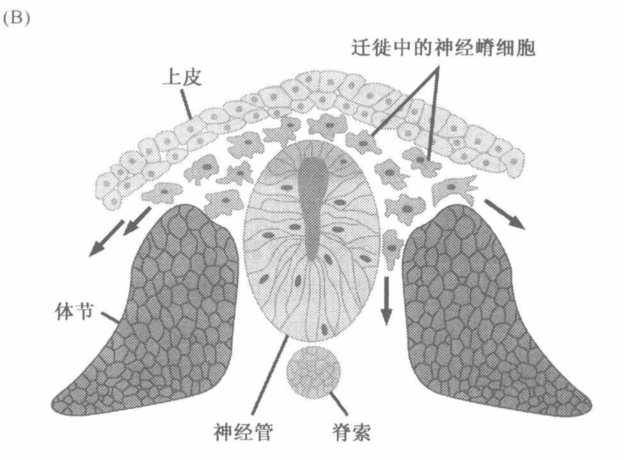


图 14.13　胚胎发生和上皮间叶转变　(A) 海胆胚胎（白色箭头）的原始外胚层细胞分层和迁入胚胎内细胞的扫描电子显微镜照片。这些细胞变圆，获得运动能力，进入中胚层并沿着早期胚胎内腔的细胞外基质迁移，这一改变与上皮间叶转变（EMT）相关。(B) 来自神经管的神经上皮细胞的分层同样需要细胞经历 EMT。胚胎神经嵴细胞（橘色）来自初始上皮神经管的上层区域（灰色），这层细胞分层获得运动和侵袭能力并向整个胚胎疏散，最终遍布整个机体，形成黑色素细胞、大部分周围神经系统和面部骨骼的多层细胞结构。(A, courtesy of: G. Cherr; B, from A. E. Vernon and C. LaBonne, Curr. Biol. 14: R719-R721, 2004.)

在早期胚胎发生的**原肠胚形成期**，外胚层单个细胞脱落，向胚胎内部中央迁移，形成中胚层——间叶组织，包括成纤维细胞和造血细胞（在脊索动物中）的前身。此时，上皮细胞层中排列的外胚层细胞，通过 EMT 转变为具有中胚层表型的细胞（图 14.13A）。同时，在胚胎中，发生 EMT 的细胞获得从一个部位（外胚层）迁移到其他（内部）部位的能力。

神经上皮细胞从神经嵴向脊椎动物早期胚胎的间叶细胞迁移也依赖于 EMT 引发的细胞表型转变（图 14.13B）。同样，肌源前体细胞（肌细胞的祖先）从早期胚胎的生皮肌节向肢芽的迁移也需要细胞表型发生 EMT 样转变。所有这些过程，与创伤边缘的上皮细胞所经历的 EMT 非常相似。这些细胞必须经历暂时性的 EMT，以便迁移到伤口位点并封闭损伤造成的上皮细胞层缺口（图 13.14）。

在侵袭到邻近组织的肿瘤边缘也可以看到 EMT 现象（图 14.14）。这一病理过程与早期胚胎发育及创伤修复过程中的 EMT 非常相似。上皮细胞再次停止表达上皮性蛋白标志，开始表达间叶细胞标志。同时，这些细胞失去上皮细胞形态，而呈现成纤维细胞的外观（图 13.13）。

肿瘤侵袭病理过程与正常胚胎发育和创伤修复过程的高度相似性揭示了一种可能的机制：依据这个近几年被许多实验证实的模型，侵袭性肿瘤细胞表现出的复杂细胞重组过程依赖于重新激活那些通常仅限于早期胚胎发生和正常成人组织损伤修复时潜在的行为程序。按照这一思路，一旦肿瘤细胞开始发生 EMT，它们可以利用这一程序来深层次地改变其表型、运动性和向邻近细胞层侵袭的能力。这种模式意味着肿瘤细胞不需要逐一获得与侵袭相关的多种细胞表型。相反，这些细胞只是活化了一个由基因组决定的形态发生程序而已（这与在 13.3 节中讨论的上皮间质相互作用是一致的，在那里曾讨论过肿瘤细胞利用创伤修复来获得活化基质的问题）。

正常和病理状态下的 EMT，除了涉及细胞形态改变和获得运动能力外，细胞基因表达谱也发生了改变（表 14.2）。上皮细胞标志——E-钙黏素和细胞角蛋白的表达受到抑制，而诱导表达一种间叶细胞细胞骨架中间纤维组成成分波形蛋白。发生 EMT 的上皮细胞通常产生纤连蛋白，该蛋白在通常情况下只是间叶细胞，如成纤维细胞分泌的一种细胞外基质蛋白。同时，表达典型的成纤维细胞标志——N-钙黏素，而取代通常的 E-钙黏素（图 14.15）。

表 14.2　与 EMT 现象相关的细胞学改变

与 EMT 现象相关的细胞学改变
缺失
细胞角蛋白（中间纤维）的表达
上皮细胞黏附连接蛋白（E-钙黏素）
上皮细胞极性
获得
成纤维细胞样形态
运动能力
侵袭性
间叶细胞基因表达谱
间叶细胞黏附连接蛋白（N-钙黏素）
蛋白酶分泌（MMP-2、MMP-9）
波形蛋白（中间纤维）表达
纤连蛋白分泌

在这所有的蛋白中，跨膜的 E-钙黏素分子在影响上皮与间叶细胞表型转变中发挥非常重要的作用。前面已经提到了 E-钙黏素在上皮细胞间黏附中发挥的作用（图 6.26A 和 13.12）。在正常上皮中，E-钙黏素分子的细胞外结构域从胞膜表面伸出，与邻近上皮细胞同样凸出在细胞表面的 E-钙黏素分子形成复合物，使得上皮细胞层邻近的细胞间形成同源二聚体桥，形成的黏附连接在维持上皮细胞层的结构完整性上起到非常重要的作用。

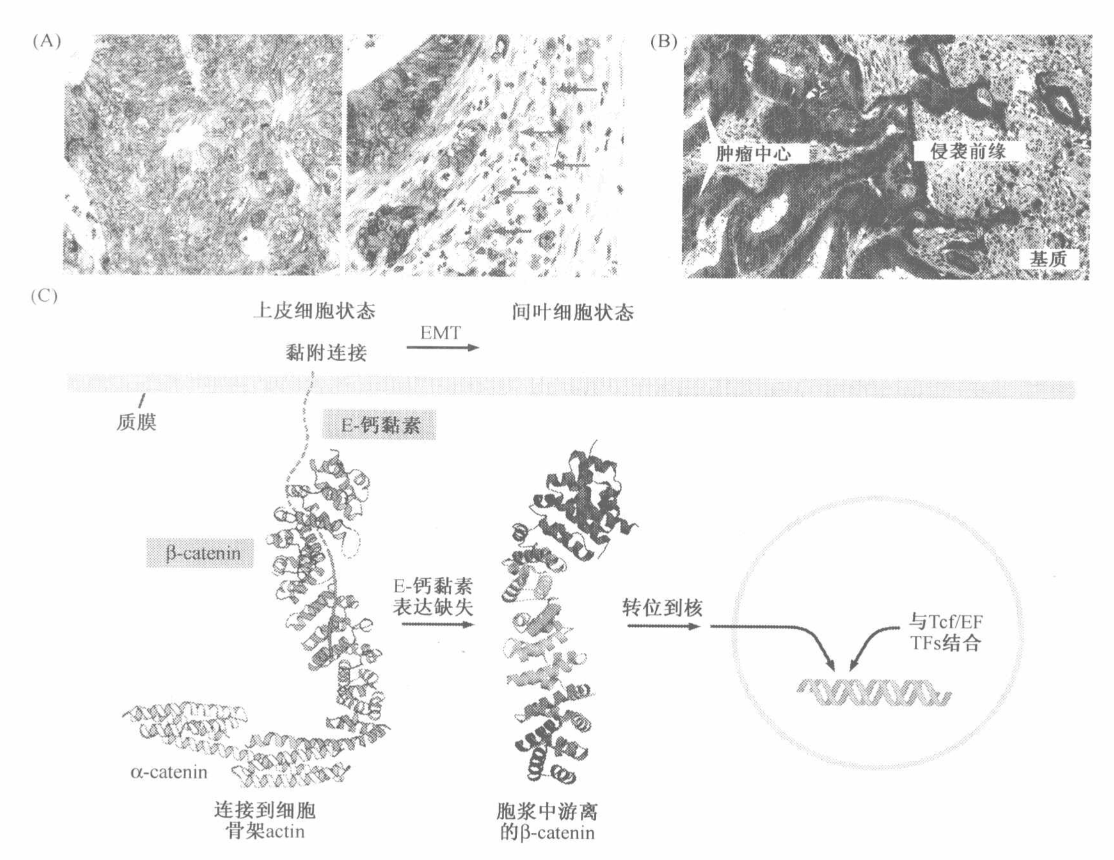


图 14.14　肿瘤侵袭前缘的上皮间叶转变　在原发瘤侵袭前缘的结肠癌细胞，其基因表达和某些蛋白质的亚细胞定位发生改变。(A) E-钙黏素（棕色）在原发瘤中心的肿瘤细胞膜高表达并形成黏附连接（左图），而在肿瘤边缘的单个侵袭性细胞中表达水平明显减少（右图，红箭头），而且不再定位于胞膜。(B) 在肿瘤中心部位的细胞表达 β-catenin（暗红色，左侧），定位于胞膜并弥散分布于胞浆。然而，肿瘤侵袭前缘的细胞表现出强的细胞核 β-catenin 着色（右侧）。(C) 正常上皮细胞中，β-ceatenin 连接 E-钙黏素的胞浆尾部和细胞骨架肌动蛋白，从而在临近细胞之间形成黏附连接（图 13.12）。此外，胞浆中的 β-catenin 是 Wnt 信号通路的重要媒介（6.10 节）。胞膜中 E-cadherin 表达缺失将释放 β-catenin 分子，使其向细胞核内转位并与 Tcf/Lef 转录因子结合，从而诱导 EMT 相关基因的表达。（A，from T. Brabletz，A. Jung，S. Reu et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：10356-10361，2001；B，courtesy of T. Brabletz and T. Kirchner；C，from T. T. Graham，C. Weavet E Mao et al. Cell 103：885-896，2000.）

单个 E-钙黏素分子的胞浆结构域通过 α-catenin 和 β-catenin 复合物及其他辅助蛋白锚定在细胞骨架的肌动蛋白纤维上（图 13.12 和图 14.14）。肌动蛋白细胞骨架为细胞提供张力，E-钙黏素分子将邻近细胞的肌动蛋白骨架交织在一起，帮助上皮细胞层抵抗撕拉机械力。一旦 E-钙黏素分子的表达受到抑制，许多与 EMT 相关的其他细胞生理学改变将会紧随其后。一些实验表明，单纯抑制 E-钙黏素表达，就会使细胞获得间叶细胞的形态并增强其运动能力。

E-钙黏素在细胞获得恶性表型中的重要作用通过以下实验得到进一步证实：在多种人类侵袭性肿瘤中，E-钙黏素编码基因 CDH1 的表达可通过启动子区域的甲基化而受到抑制（表 7.2），还可以通过某些转录抑制因子或移码突变而失活。例如，对 26 种人类乳腺癌细胞系的分析表明，8 种细胞由于突变导致 E-钙黏素基因表达失活，其中 5 种

存在 E-钙黏素读码框的截短式突变，3 种存在读码框内序列缺失，导致细胞表面表达突变型的 E-钙黏素分子。到目前为止，在晚期乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、食管癌、皮肤癌、肾癌和肺癌中都发现了 E-钙黏素表达缺失或突变蛋白，CDH1 基因的种系突变会导致家族性胃癌（表 7.1）。

此外，对一些 E-钙黏素表达缺失肿瘤细胞的研究发现，通过将 E-钙黏素表达载体转入细胞使该蛋白重新表达可以强烈抑制细胞的侵袭和转移播散能力。这些结果还表明，E-钙黏素的表达水平在上皮来源癌细胞的生物学行为中起到至关重要的作用，由 E-钙黏素介导的细胞-细胞间黏附阻止了侵袭及转移的发生。

在 EMT 过程中 E-钙黏素表达被 N-钙黏素取代的现象，在早期胚胎的原肠胚形成阶段也可以看到（图 14.15B）。而且，培养的上皮细胞中（来自胚胎外胚层），肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）促进 E-钙黏素向 N-钙黏素的转变。由此可以诱导 EMT，使得肌细胞和皮肤前体细胞从原始的生皮肌节迁出，而后者包括早期脊椎动物胚胎体节中的上皮样细胞。在肿瘤的病因学研究中，HGF 能有效地诱导肿瘤

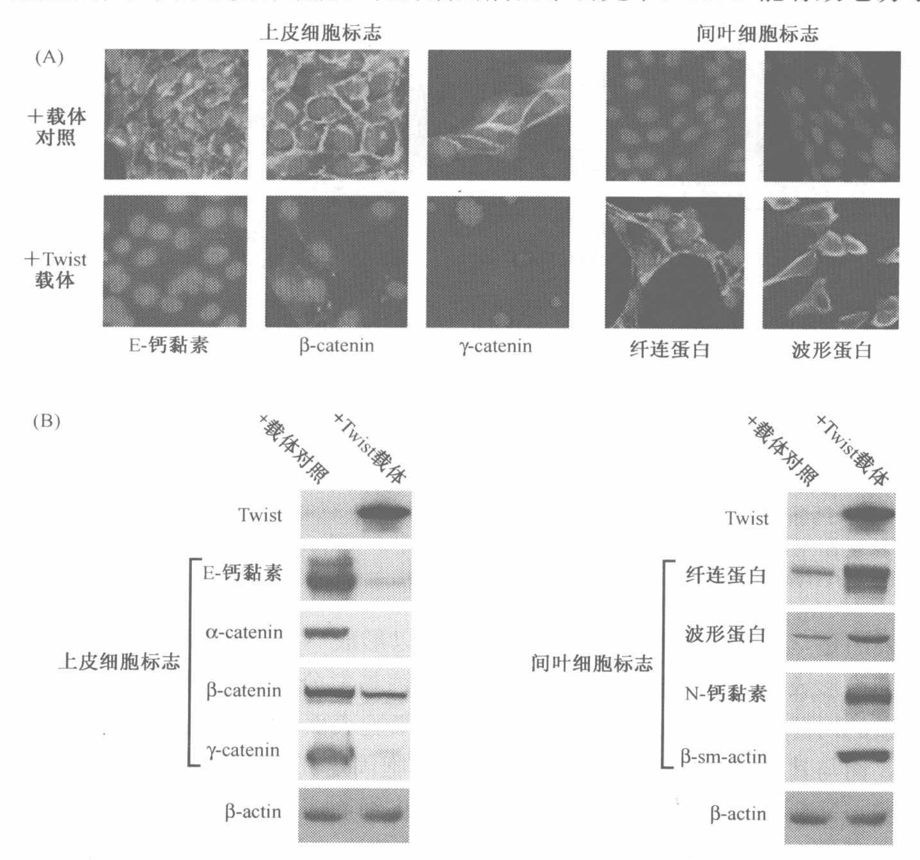


图 14.15　伴随 EMT 发生的生物化学改变　EMT 可以被多种转录因子所诱导，这里展示的是在上皮细胞生物学研究中广泛应用的 MDCK（Maden-Darby canine kidney）细胞中转录因子 Twist 的表达和作用。(A) 免疫荧光分析表明，当异位表达转录因子 Twist 时，一些上皮细胞标志，特别是 E-钙黏素、γ-catenin 和 β-catenin 表达下调，而诱导表达间叶细胞标志，如波形蛋白和纤连蛋白。(B) 相对定量的免疫印记分析证实了免疫荧光的结果。左侧泳道为对照细胞裂解液，右侧泳道为异位表达 Twist 的 MDCK 细胞裂解液。β-actin 的表达水平不受 EMT 的影响，作为上样量对照。（A and B, from J. Yang, S. A. Mani, J. L. Donaher et al., Cell 117：927-939，2004.）

细胞的运动和侵袭能力。

如同E-钙黏素一样，N-钙黏素也参与细胞间的同型相互作用，也就是说，它们结合在邻近细胞表面相同类型的其他分子上。因此，表达在发生了EMT肿瘤细胞表面的N-钙黏素分子，增强了肿瘤细胞与正常表达N-钙黏素的间质细胞的亲和性，特别是与上皮细胞层下方基质中的成纤维细胞。这种结合有利于侵袭的肿瘤细胞侵入基质细胞群。黑色素瘤的发展可以用这一动态模型解释：正常的黑色素细胞表达E-钙黏素，使得它们与周围的角化细胞结合。黑色素瘤细胞——黑色素细胞的转化衍生物表达N-钙黏素，从而易化了它们侵袭皮肤真皮层基质并与成纤维细胞和内皮细胞的相互作用（图14.16）。

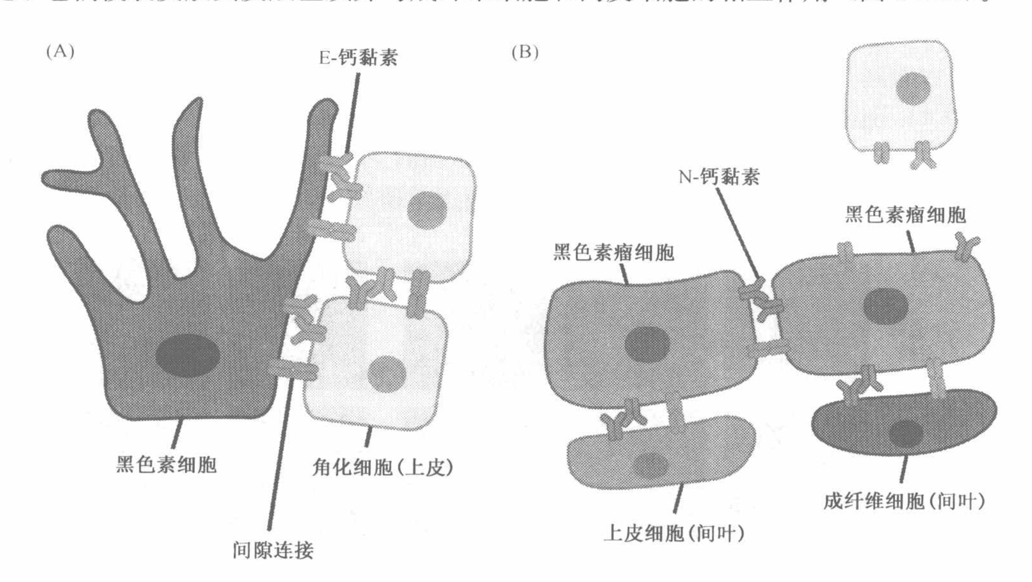


图14.16　钙黏素表达转变和黑色素瘤细胞的侵袭性　黑色素瘤是高度恶性的肿瘤，进展到特定阶段会发生广泛转移。这种行为可以部分归因于其神经嵴前体细胞迁移行为的再次活化。当黑色素细胞（A）转化为黑色素瘤细胞（B）时，钙黏素发生从E-型到N-型的转变，导致基质侵袭，因为E-钙黏素（蓝色）表达缺失，使肿瘤细胞脱离上皮层中邻近的角化细胞；而N-钙黏素（红色）表达，使它们与各种间叶细胞（如成纤维细胞、内皮细胞等）发生同型相互作用，使其停留在皮肤基质，如真皮层中。（From N. K Haass，K. S. M Smalley and M. Herlyn，J. Mol Histol. 35：309-318，2004.）

重要的是，虽然从原理上讲，细胞间也可以形成N-钙黏素桥，但是其表达并不导致肿瘤细胞形成大的片层样结构。看起来，N-钙黏素分子间形成的作用力要明显弱于E-钙黏素的同源二聚体。这有助于解释为什么细胞表面的N-钙黏素分子易化细胞的运动能力，而与其同家族的E-钙黏素则可以使细胞固定在上皮细胞层。这一结论可以由实验证实：N-钙黏素表达载体使正常培养的上皮细胞表达高水平的N-钙黏素，而这一异位表达可使上皮细胞获得运动和侵袭能力，表现在它们可以突破重建的细胞外基质进入培养皿中。

14.4　通常由基质信号诱导上皮-间叶转变

如前所述，上皮-间叶转变（epithelial-mesenchymal transition，EMT）似乎是使

肿瘤细胞获得高度恶性生长状态的一种不可逆的生物学过程，但实际上，很多证据表明在多种类型肿瘤的发生发展过程中，EMT 表型是完全可逆的。一旦肿瘤细胞完成了多步骤的侵袭转移过程，它们通常还要经过间叶-上皮转变（mesenchymal-epithelial transition，MET）过程而恢复上皮样细胞表型。

这一可逆过程表明，EMT 现象通常由肿瘤细胞所处的周围环境信号激发。也就是说，处于原发灶侵袭性前缘的肿瘤细胞可以从邻近的反应性基质（13.3 节）中获得特异性信号，这些反应性基质在肿瘤发生发展过程中就已经逐步形成了。然而，一旦这些肿瘤细胞离开了肿瘤原发灶并向远处迁移，这时它们所处的间质环境可能并不释放 EMT 诱发信号，部分肿瘤细胞就会发生间叶-上皮转换，恢复它们的祖先细胞在肿瘤原发灶中的表型（图 14.17；信息栏 14.5）。

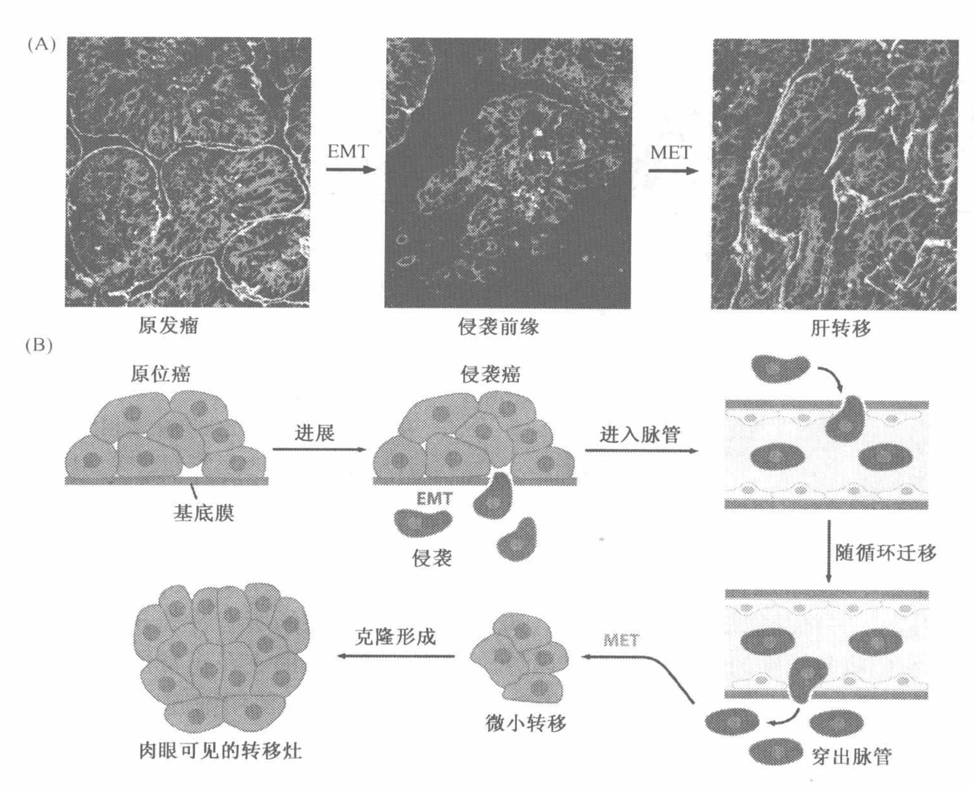


图 14.17 EMT 的可逆性转变 处于原发性肿瘤侵袭性前缘的细胞通常表现出 EMT，衍生出的转移灶具有和原发性肿瘤中心区域一致的组织学类型。(A) 释放基质降解酶，特别是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase，MMP)，这是发生 EMT 的主要表现之一。图中可见，原发性结直肠癌细胞表达角蛋白 18（红色）和基底膜蛋白（绿色）。但处于侵袭性前沿的，发生部分 EMT 转变的细胞，降解了邻近的基底膜，但仍然表达重要的上皮细胞标志物——角蛋白 18。在该患者后来出现的转移播散灶中，肿瘤细胞再次形成与原发性肿瘤中心区域相同的组织学结构。(B) 上图提到的过程可以用下面的示意图表示，位于原发性肿瘤边缘的上皮样癌细胞（粉红色）发生 EMT，侵入基质并转变为间叶细胞（用红色细胞表示）。这一转变似乎是由肿瘤相关基质释放的信号所激发的。新获得的间叶细胞状态使细胞能够局部侵袭、进入血管，随后穿出血管进入远处的实质组织。一旦转移灶建立，这些细胞将处于一个新的、缺乏先前诱导它们祖先细胞发生 EMT 的基质环境下，使得这些细胞经过间叶-上皮转换重新回到上皮样细胞表型（重建的基底膜未标示）。(A，courtesy of T. Brabletz；B，adapted from J. P. Thiery，Nat. Rev. Cancer 2：442-454，2002.)

信息栏 14.5 EMT 的可逆性解释了转移的一个特性 所有具有侵袭转移能力的肿瘤细胞都需要经历 EMT 获得复杂的表型（发生完全 EMT 转变的细胞将失去全部的上皮样细胞特征，而发生部分 EMT 的细胞，除了新获得的间叶细胞特征外，仍保留部分上皮样细胞特征）。这一行为似乎与在转移现象中经常观察到的现象相矛盾：在组织病理学水平上，继发灶与它所起源的原发性肿瘤高度相似（如图 14.17A 和图 14.18）。但也的确发现在转移灶中的细胞与原发性肿瘤一样的现象，它们具有相似的上皮样细胞特征。为了易化转移播散，这些侵袭性细胞发生了 EMT。如果承认 EMT 现象是可逆的，这一矛盾则很容易解释，也就是说，高度恶性的肿瘤细胞通过暂时性转变为间叶细胞状态从而实现转移步骤。

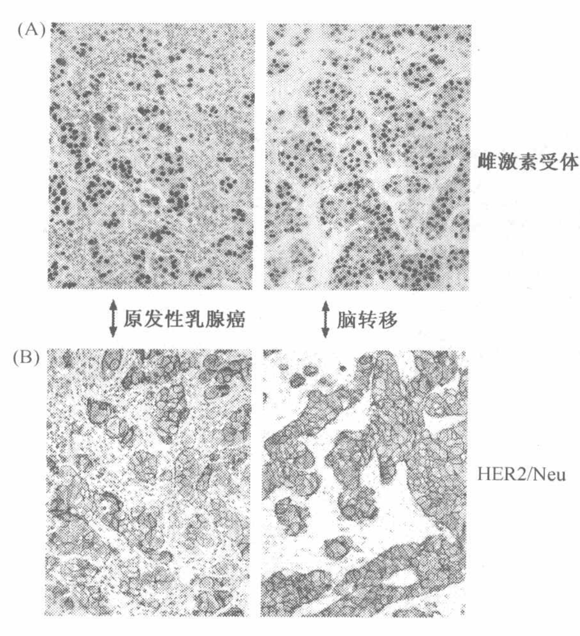


图 14.18 原发性肿瘤及其继发性转移灶的外观 这些显微照片显示一例手术切除的原发性乳腺癌组织（左图）和该患者两年后发现的脑转移灶（右图）的组织学表现和标志分子表达的高度相似性。（A）雌激素受体免疫组织化学染色结果表明，原发灶和转移灶中的肿瘤细胞均为胞核阳性染色（棕色）。（B）HER2/Neu 的免疫组织化学染色结果表明，原发灶和转移灶中的肿瘤细胞均表现为棕色的细胞膜染色。从中可见原发灶和转移灶的上皮和基质细胞非常相似，这种相似性经常成为病理学家判断转移灶来源的依据，而支持图 14.17B 中的转移模型（Courtesy of T. A. Ince.）。

实际上，传统的组织病理学技术很难证明原发性肿瘤侵袭性前缘的 EMT 现象，这主要是因为，一旦肿瘤细胞发生 EMT（如失去上皮样细胞的所有特性并获得间叶细胞表型），它们将与周围的间质细胞难以区分。因此，必须借助于在正常情况下并不在诊断病理学实验室使用的抗体和细胞学试剂才能加以判断，如使用细胞内 β-catenin 的荧光标记抗体等（图 14.14B）。另一个例子来自人类异种移植肿瘤细胞，免疫学染色表明它们表达 αvβ6 整联蛋白（图 14.19A）。αvβ6 整联蛋白是 EMT 的另一个标志分子，它仅定位于紧邻肿瘤相关基质的外层肿瘤细胞上。

EMT 现象的另一个标志物是 laminin 2γ，该蛋白是 laminin-5 的三个亚基之一，而 laminin-5 是细胞基底膜的重要组成成分，上皮细胞借助特定的整联蛋白与其结合。但当上皮细胞发生 EMT 并具有侵袭性后，仅能释放 laminin 2γ（而不包括 laminin-5 的其他两个亚基）。laminin 2γ 被基质金属蛋白酶（14.6 节）切割，释放出具有类似 EGF 功能，能与 EGF 受体结合的片段，从而易化细胞的生存和运动能力（图 14.19B）。

展示肿瘤侵袭前缘癌细胞表型转换最直接和生动的方式是使用人类特异的抗波形蛋白（vimentin）抗体。当将实验转化的人类乳腺上皮细胞接种到免疫缺陷小鼠体内，并形成异种移植肿瘤时，它可以清楚地在侵袭前缘标示出 EMT 现象（图 14.19C 和 D）

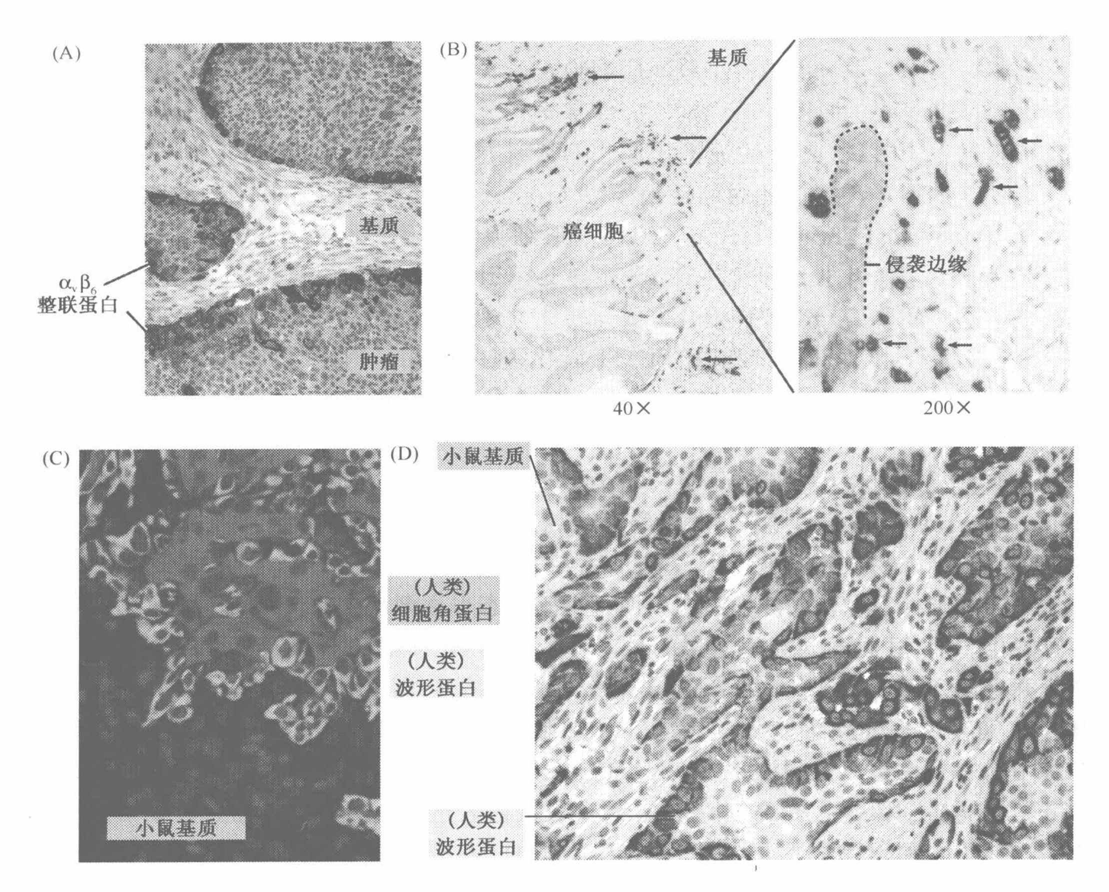


图 14.19　肿瘤上皮和间质交界处的 EMT 现象　(A) 表达 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白与 EMT 现象相关。这种整联蛋白在慢性炎症或创伤后愈合的上皮组织表达，也可见于癌组织侵袭前缘的肿瘤细胞。在底特律 562 人类咽癌细胞系的体外移植物中，位于侵袭前缘的肿瘤细胞表达 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白（深棕色），而且这些细胞与肿瘤相关基质直接接触，表明在这些上皮细胞中基质信号促进该蛋白的表达。(B) laminin 2γ 在正常情况下，是基底膜重要组成成分，异源三聚体的 laminin-5 分子的其中一个亚基（图 13.5）。然而，肿瘤侵袭前缘发生 EMT 的细胞仅分泌 laminin 2γ 亚基。在细胞外基质中，该蛋白被一种基质金属蛋白酶（MT1-MMP）切割成具有 EGF 受体配体功能的片段，促进细胞的生存和运动能力。在这张照片上，人类结肠癌组织侵袭性前缘的肿瘤细胞（点状线，左侧图）已经开始侵入间质（右侧图）。免疫组织化学染色结果表明，已经深入到基质中的个别癌细胞表达高水平的 laminin 2γ（棕色，箭头所示）。(C) 实验转化的人类乳腺上皮细胞（mammary epithelial cell，MEC）被移植到免疫缺陷小鼠体内。朝向肿瘤中心的角蛋白表达阳性的人类癌细胞（红色）并不直接接触周围的小鼠间质细胞，而后者仅能通过 DAPI 的细胞核染色（蓝色）标示出来。但是，许多与小鼠间质直接接触的人类 MEC 已经发生了 EMT，表现为角蛋白染色的丢失和人类特异的波形蛋白染色（绿色）（使用特异性识别人源性而非鼠源性波形蛋白的抗体，确保了侵袭前缘的绿色染色细胞来自于人类异种移植肿瘤而非小鼠的宿主细胞）。而且，侵袭前缘的某些肿瘤细胞已经失去了上皮细胞的立方形形态，而呈现出一种拉伸的纤维母细胞形态。(D) 侵袭前缘的癌细胞岛选择性表达波形蛋白。这是与 C 图中相同的人类实验转化 MEC 异种移植肿瘤的低倍照片。借由人类波形蛋白的免疫组织化学染色（棕色）可以看出，与周围间质直接接触的癌细胞发生了 EMT，而在癌细胞岛内部的肿瘤细胞不表达波形蛋白，仍然维持上皮样细胞形态。(A，courtesy of D. R，Leone，B. M. Dolinski，and S. M. Violette，Biogenldec；B，from E. Shinto，H. Tsuda，H. Ueno et al.，Lab. Invest. 85：257-266，2005；C，courtesy of K. Hartwell and T. A. Ince；D，courtesy of T. A. Ince.)

（在这种情况下，使用人类特异抗体确保表达波形蛋白的细胞来自角蛋白染色阳性的人类癌细胞，而不是来自周围的小鼠间质细胞）。

上述证据表明，原发性癌周围反应性基质产生的特定的异源信号，诱导肿瘤边缘的上皮细胞发生 EMT。大量的证据表明，TGF-β 是一个重要的间质信号传递媒介。此外，多种其他因子，包括肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）、肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）和胰岛素样生长因子-1（insulin-like growth factor-1，IGF-1）也参与这一过程。看起来，这些间质信号以各种组合方式与转化上皮细胞内的某些突变基因产物结合（如癌基因 *ras* 等），从而激活细胞内的 EMT 转化程序（EMT 诱导因子的多样性反映了正常胚胎发育过程多阶段多步骤的特点，因为它就是在发育中胚胎的各种部位由各种异源信号诱导的）。

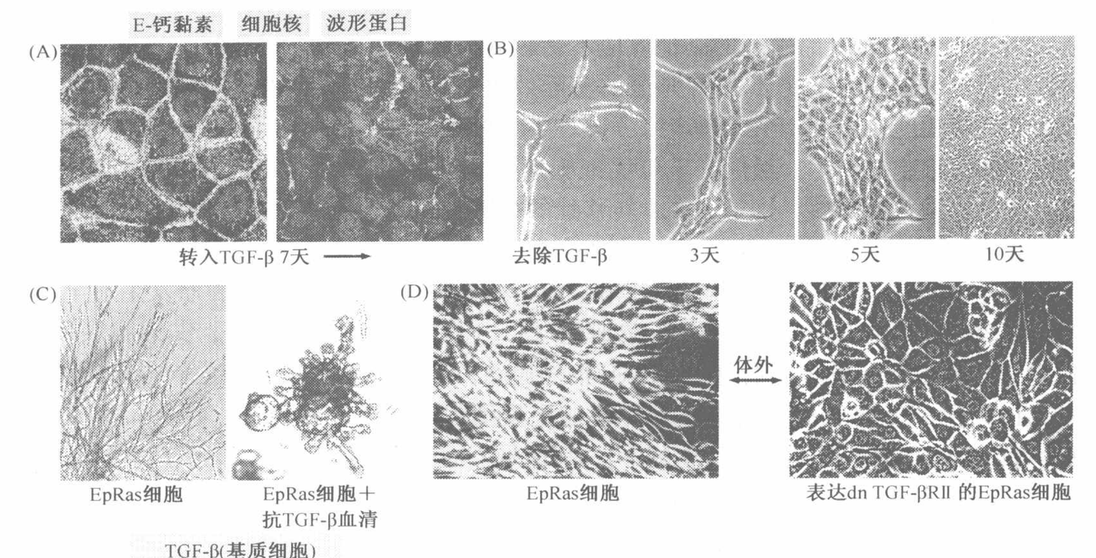
一组颇有影响力的实验证明，当 ras 转化的 EpRas 小鼠乳腺上皮细胞（mouse mammary epithelial cell，MEC）接受 TGF-β 刺激后，会逐步失去上皮细胞形态，并下调上皮细胞标志物，如细胞角蛋白和 E-钙黏素的表达。与此同时，这些转化细胞开始表达间叶细胞标志物，如波形蛋白，而且细胞形态也逐渐趋向于纤维母细胞。上述特征都是发生了 EMT 的标志。有意思的是，一旦 ras 转化细胞发生了 EMT，它们开始自己产生并分泌 TGF-β1。这种 TGF-β1 经自分泌反馈信号作用于自身，即使人为撤掉培养基中的 TGF-β 也能使细胞长期维持间叶细胞表型（图 14.20A～D）。上述研究表明，TGF-β 信号通路可以协同癌基因 *ras*，促进 EMT 的发生。同样，通过正反馈环路维持 TGF-β 信号，对维持人类癌细胞中 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白表达和 EMT 现象也具有非常重要的作用。而且，肿瘤相关基质通常可以产生大量的 TGF-β1（图 14.20E）。

Ras 的两个下游效应蛋白（见 6.5 节和 6.6 节）可能导致 Ras 和 TGF-β 信号的协同效应。癌蛋白 Raf 位于 Ras 的直接下游，它本身就可以诱发 EMT，此外还可以使转化的 EpRas 细胞分泌 TGF-β，而后者以正反馈自分泌信号的方式诱导 EMT 的发生。PI3K 是癌蛋白 Ras 的另一个效应者，它可以保护 Ras 转化细胞不受 TGF-β 细胞抑制和促凋亡效应的影响。

一个相关的机制似乎同样可以解释癌基因 *ras* 活化引发的小鼠皮肤癌进展。这种肿瘤中的细胞由高度分化的鳞状上皮细胞表型（图 2.6A 和 B）转变成梭形细胞并发生侵袭转移（梭形细胞具有与转化的纤维母细胞相似的细胞形态）。逐步进展到高度恶性状态的细胞伴随着癌蛋白 Ras 表达水平逐渐增加和转录因子 Smad2 的核累积，或者说这种进展可能是由两者引起的，而 Smad2 的核累积表明 TGF-β 信号通路的活化。

TGF-β 促进恶性肿瘤细胞进展的作用与我们前面讨论的其抗增生效应相矛盾（补充材料 29 ◎）。大量支持 TGF-β 促进癌变细胞生物学行为的证据都来自一个现象，即肿瘤相关 TGF-β（TGF-β1）的表达水平与肿瘤的侵袭性呈正相关。的确，无论是肿瘤组织内还是循环体液中高水平的 TGF-β，都与肿瘤患者的长期生存呈负相关性。

总之，TGF-β 至少通过 4 种方式促进肿瘤细胞侵袭。首先，大多数肠道以外发生的人类肿瘤都保留了部分 TGF-β 受体信号功能，这使得它们在肿瘤发生发展的各个时期都能对 TGF-β 信号做出反应（与此形成鲜明对比的是，一组结肠癌患者因为 TGF-β 受体编码基因突变而发生功能缺失；见 12.9 节）。其次，大多数人类肿瘤都有 pRb 信



(E)

$\alpha_v\beta_6$整联蛋白(上皮细胞)

图 14.20 TGF-β 控制 EMT 及其对肿瘤细胞的作用 EpH4 细胞系中的小鼠乳腺上皮细胞（mouse mammary epithelial cell，MEC）经癌基因 ras 转化后，命名为 EpRas 细胞。(A) EpRas 细胞（左侧）通常具有鹅卵石样的上皮细胞形态，并且在细胞—细胞连接处表达 E-钙黏素（绿色）。但是，在存在 TGF-β1 的条件下培养 7 天后（右图），它们发生了 EMT 并具有伸展的纤维母细胞形态（此图未显示）。另外，E-钙黏素表达受到抑制而表达波形蛋白（红色），由上皮细胞基因表达模式转换为间叶细胞模式。细胞核经 DAPI 染为蓝色。(B) EpRas 细胞发生 EMT 后（A 图），它们通过正反馈性自分泌 TGF-β1 维持其纤维母细胞样的间叶细胞形态。但当通过每日更换培养液，去除细胞分泌到培养液中的 TGF-β1 时，它们的细胞形态又逐渐转变为鹅卵石样上皮细胞形态。如图所示，培养 3 天、5 天和 10 天（从左向右）后，细胞又逐渐发生了间叶-上皮转换（MET）。(C) 当肿瘤中的 EpRas 细胞在高浓度的自分泌 TGF-β1 作用下，将其放入离体的胶原胶中（模拟基质），它们会形成高度侵袭性的结构（左图）。但是，当使用拮抗 TGF-β1 的抗血清（中和细胞分泌的 TGF-β1），将这些细胞进行体外传代培养时，它们又重新转变成上皮样细胞表型并在胶原胶中形成导管样结构，这与体外培养的正常 MEC 细胞的生物学行为基本一致（右图）。(D) 使用显性负突变（dominant-negative，dn）的 II 型 TGF-β 受体（有效封闭 TGF-β 的自分泌正反馈信号通路），进一步证明 EpRas 细胞中的 TGF-β1 自分泌信号是维持其间叶细胞状态所必需的。当此受体的表达封闭了 TGF-β1 自分泌信号后，EpRas 细胞的间叶细胞表型消失（左），出现上皮细胞形态（右）。这一结果同样表明细胞发生了间叶-上皮转换（MET）。(E) 当邻近的肿瘤相关间质产生并分泌 TGF-β 时，肿瘤中的底特律 562 人类咽癌细胞将表达 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白（红色，图 14.19A），结果表明这些细胞发生了 EMT。肿瘤细胞中 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白的表达可以促使间质细胞产生 TGF-β，这一强效的 EMT 诱发剂又诱导上皮细胞表达 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白，从而在肿瘤中形成一个相对独立的正反馈调节环路。（A，from E. Janda，K. Lehmann，I. Killisch et al.，J. Cell Biol. 156：299-314，2002；B and C，from M. Oft，J. Peli，C. Rudaz et al.，Genes Dev. 10：2462-2477，1996；D and E，courtesy of D. R. Leone，B. M. Dolinski and S. M. Violette，Biogenldec.）

号通路失活，这使得细胞对 TGF-β 引起的细胞生长抑制效应失去响应（8.10 节），但是 TGF-β 受体信号通路引起的其他效应不受影响。第三，在失去了 TGF-β 细胞生长抑制效应后，肿瘤细胞接受 TGF-β 刺激的实际效果将促进细胞的增生。例如，神经胶质瘤和骨肉瘤细胞接受 TGF-β 刺激时，可以产生并分泌 PDGF，而后者以自分泌作用方式促进肿瘤细胞的增生。最后，乳腺癌细胞接受 TGF-β 刺激后可以产生并释放其他因子，从而加速骨质降解，这是形成骨转移灶的关键步骤。骨质降解还可以释放其他的有丝分裂原，促进细胞增生，这一点后面还会提到。

此外，TNF-α 可以单独或与 TGF-β 一起，诱导 EMT 的发生。在肿瘤发生的早期，TNF-α 经常由炎症细胞产生，如巨噬细胞（11.16 节）。此时，它与上皮细胞表面的 TNF-α 受体结合，激活细胞内的 NF-κB 信号通路。TGF-β 在上皮细胞内同样可以激活 NF-κB，比如上面提到的永生化的小鼠乳腺上皮细胞。在多种肿瘤中，TNF-α 和 TGF-β 均可以不同程度地长期维持活化的 NF-κB 信号，而后者对于诱导和维持 EMT 至关重要，正像 EpRas 小鼠乳腺上皮细胞中的研究工作所证实的那样。因此，封闭 NF-κB 信号将抑制 EMT 的发生（图 14.21）。

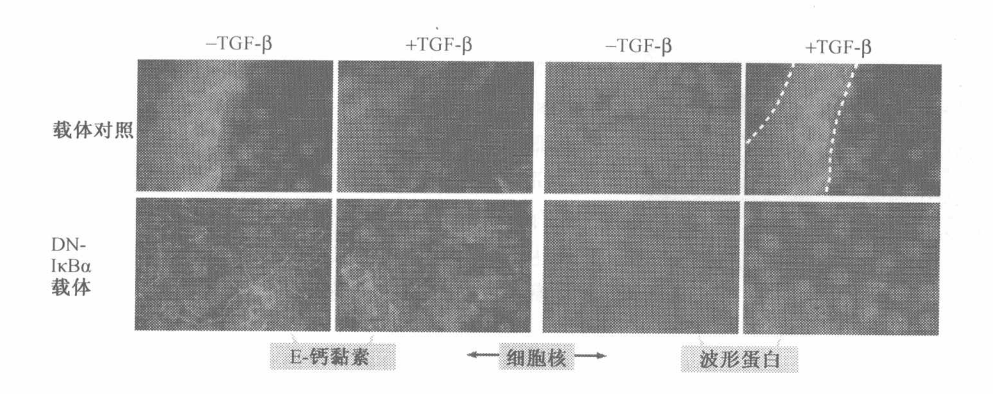


图 14.21　NF-κB 信号通路可以诱导 EMT 发生　EpRas 转化小鼠乳腺上皮细胞（见图 14.20）给予 TGF-β 处理（上面一行的第二和第四张图），导致 E-钙黏素表达抑制（粉色，上面一行的第一和第二张图），同时，波形蛋白诱导表达（粉色，上面一行的第三和第四张图）。但当显性负突变形式的 IκBα 在细胞内表达时（下面一行），由于 NF-κB 信号受到抑制，TGF-β 刺激不能再抑制 E-钙黏素（粉色，第一和第二张图）并诱导波形蛋白表达（粉色，第三和第四张图）。这表明在这些细胞内 NF-κB 信号对于 EMT 的诱导是必需的。其他实验证据（此处未显示）也证明，组成性激活的 NF-κB 信号足以诱导细胞发生 EMT。（From M. A. Huber，N. Azoitei，B. Baumann et al.，J. Clin. Invest. 114：569-581，2004.）

关于间质巨噬细胞对原发性肿瘤细胞侵袭转移能力的影响，主要来自对集落刺激因子-1（colony-stimulating factor，CSF-1）缺乏的遗传缺陷小鼠的实验研究。正如我们在上一章谈到的，肿瘤易感转基因小鼠发生的乳腺癌通常募集大量的肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophage，TAM）。但是，当这种小鼠的肿瘤细胞失去产生 CSF-1 的能力时，TAM 则很难见到（图 13.24）。缺乏 CSF-1 和 TAM 并不会影响肿瘤细胞的

生长（图 14.22A），但是这样的肿瘤细胞比起募集到大量 TAM 的肿瘤细胞来说，表现出良性、非侵袭性表型（图 14.22B）。而且，这些巨噬细胞对转移能力的影响是惊人的，没有 TAM，乳腺癌细胞将不能转移到肺（图 14.22C）。

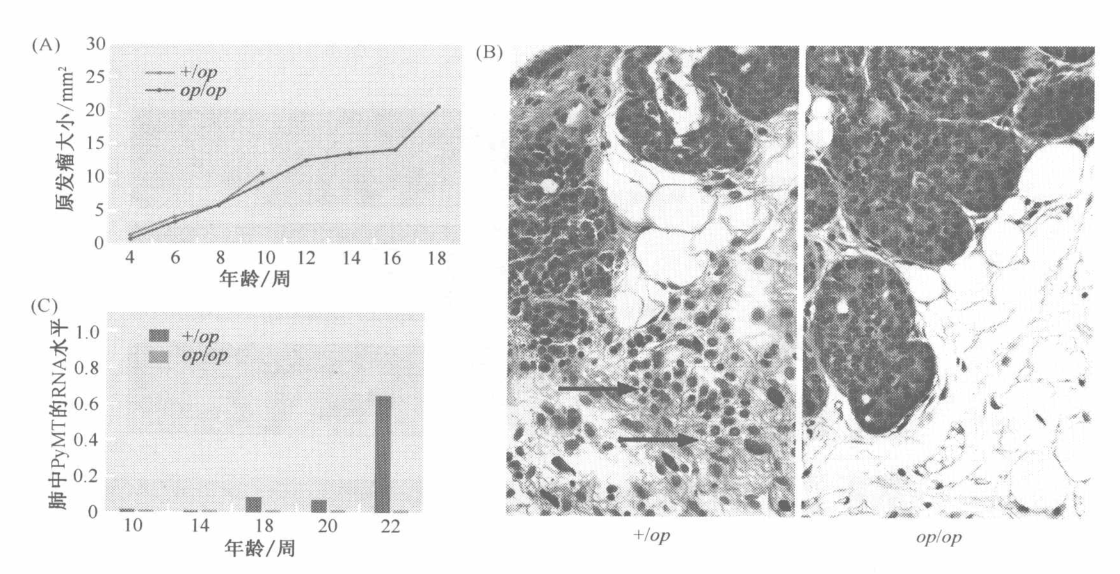


图 14.22 巨噬细胞对肿瘤侵袭转移能力的影响 将 MMTV 启动子驱动下的多瘤病毒 MT（polyoma middle T，PyMT）癌基因导入骨骼硬化症小鼠，使之形成自发性乳腺癌。已知该小鼠通过繁殖，可以形成产生 CSF-1 的 $Csf^{+/op}$ 鼠和不能产生 CSF-1 的隐形纯合 $Csf^{op/op}$ 鼠，而 CSF-1 可以在肿瘤组织中募集巨噬细胞（图 13.24）。（A）$Csf^{+/op}$ 小鼠中存在募集的肿瘤相关巨噬细胞（TMA），而 $Csf^{op/op}$ 小鼠不存在。但是，在这两种小鼠中 TMA 的有和无，对于原发性乳腺癌细胞的生长没有影响。（B）$Csf^{+/op}$ 小鼠的乳腺肿瘤（包含许多 TMA，此处未显示）具有高度侵袭性表型，大量的单个肿瘤细胞侵入周围的间质组织（左图，箭头所示）。但是，$Csf^{op/op}$ 小鼠中，巨噬细胞不能被募集到肿瘤相关间质（右图）。在此情况下，肿瘤具有完整包膜，细胞不能突破基底膜，表现为良性，这表明巨噬细胞是肿瘤侵袭所必需的。（C）在 $Csf^{+/op}$ 小鼠中，肺转移灶在 18 周龄即可出现，且随着周龄增加而逐渐增加（蓝色柱），这里是通过衡量肺组织中 PyMT 的 RNA 水平（只在肿瘤细胞表达）来评价的（纵轴）。但是，TMA 阴性的 $Csf^{op/op}$ 小鼠（橙色柱），并不存在肺转移现象。（From E. Y. Lin，A. V. Nguyen，R. G. Russell and J. W. Pollard，J. Exp. Med. 193：727-740，2001.）

这些令人信服的实验证据表明，小鼠乳腺癌细胞的侵袭转移能力明显受间质信号的影响，在本实验中主要是巨噬细胞。然而，这些信号究竟是什么我们还不清楚。巨噬细胞源性的 TNF-α 可能诱导肿瘤细胞发生 EMT，进而发生如图 14.22 所描述的侵袭转移行为。另一个关键的巨噬细胞源性信号很可能是由 EGF 介导的。

小鼠乳腺癌细胞的体内和体外实验结果表明，EGF 是肿瘤细胞侵袭的主要诱导因子。像多数上皮细胞一样，这些肿瘤细胞表达 EGF 受体，EGF 与其受体结合导致细胞获得运动侵袭能力并分泌 CSF-1，而后者可以趋化吸引并活化巨噬细胞（图 14.23）。巨噬细胞对 CSF-1 刺激的反应为增生和分泌 EGF，EGF 又可以反过来激活肿瘤细胞。这些效应都是由旁分泌而不是自分泌信号引发的，因为乳腺癌细胞并不表达 CSF-1 受

体而巨噬细胞不表达 EGF 受体（图 14.23A）。这两种细胞互惠合作，彼此刺激，于是产生了另一种类型的正反馈调节环路。上述实验清楚地证明了肿瘤细胞的运动性和侵袭性，但是必须认识到，肿瘤细胞只有在获得了运动侵袭能力以后才能诱发 EMT。HGF 是肿瘤间质中的另一种配体，它同样可以在上皮细胞中诱导 EMT 的发生，而这些细胞表面通常具有 HGF 的受体 Met（图 14.24）。

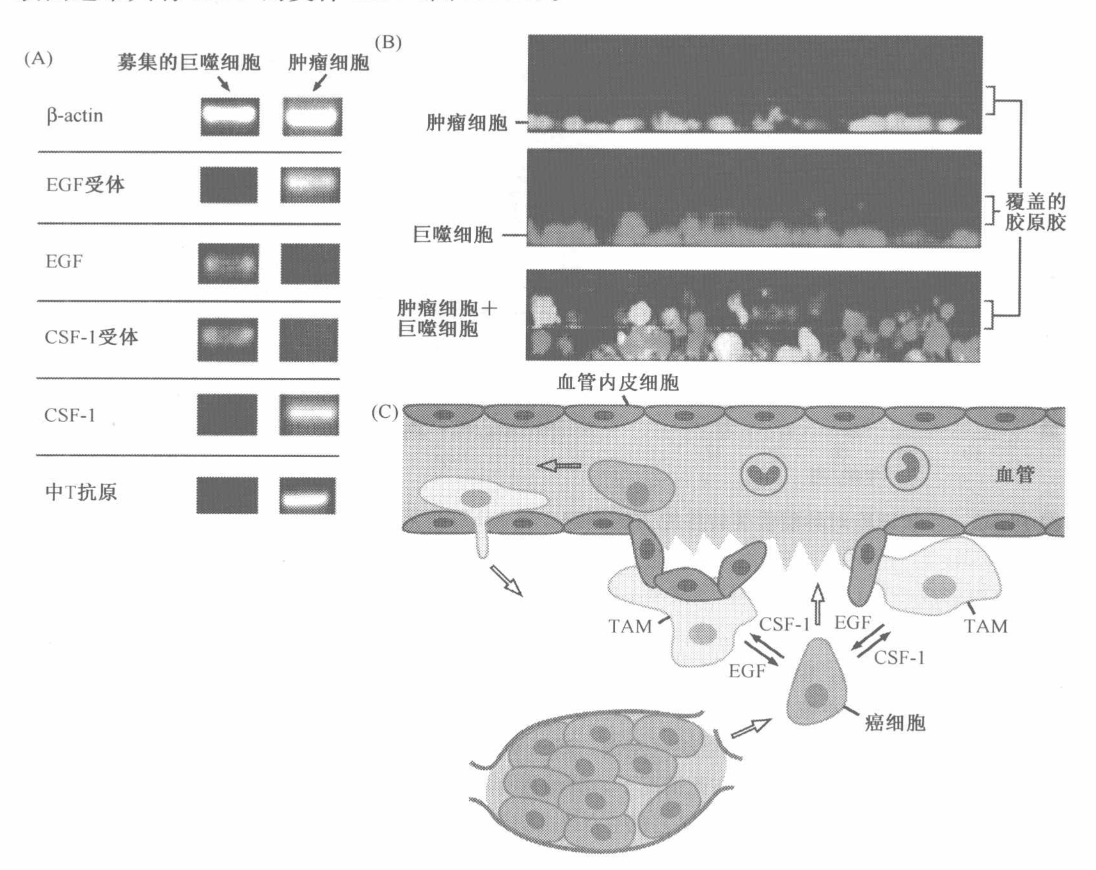


图 14.23　乳腺癌细胞和巨噬细胞之间的互惠合作　各种实验结果表明，乳腺癌中 EGF 的主要来源是巨噬细胞。已知 EGF 可以刺激上皮细胞增生并侵袭细胞外基质。另外，EGF 还可以使乳腺癌细胞分泌 CSF-1，这使得它们可以募集巨噬细胞，并使之分泌更多的 EGF，从而形成两种细胞类型之间的正反馈调节环路。(A) 利用 PCR 分析发现，肿瘤易感的转基因小鼠（见图 14.22），其乳腺癌细胞和间质巨噬细胞中，这两种生长因子及其受体的 mRNA 表达水平是相反的。(B) 乳腺癌细胞（此处用绿色荧光蛋白标记）置于培养皿底部（侧面观），上面铺一层胶原胶（上图）。以此方法，同样处理巨噬细胞（红色）（中图）。当两种细胞共培养时，可以发现，乳腺癌细胞被诱导上移并侵入胶原基质（下图）。(C) 乳腺癌细胞和巨噬细胞之间的交互作用示意图。因为巨噬细胞通常在微血管附近，所以肿瘤相关巨噬细胞（TAM）刺激乳腺癌细胞运动侵袭性的直接效果之一是使肿瘤细胞侵入血管。（A，from J. Wyckoff，W. Wang，E. Y. Lin et al.，Cancer Res. 64：7022-7029，2004；B，from S. Goswami，E. Sahai，J. B. Wyckoff et al.，Cancer Res. 65：5278-5283，2005；C，from W. Wang，S. Goswami，E. Sahai et al.，Trends Cell Biol. 15：138-145，2005.）

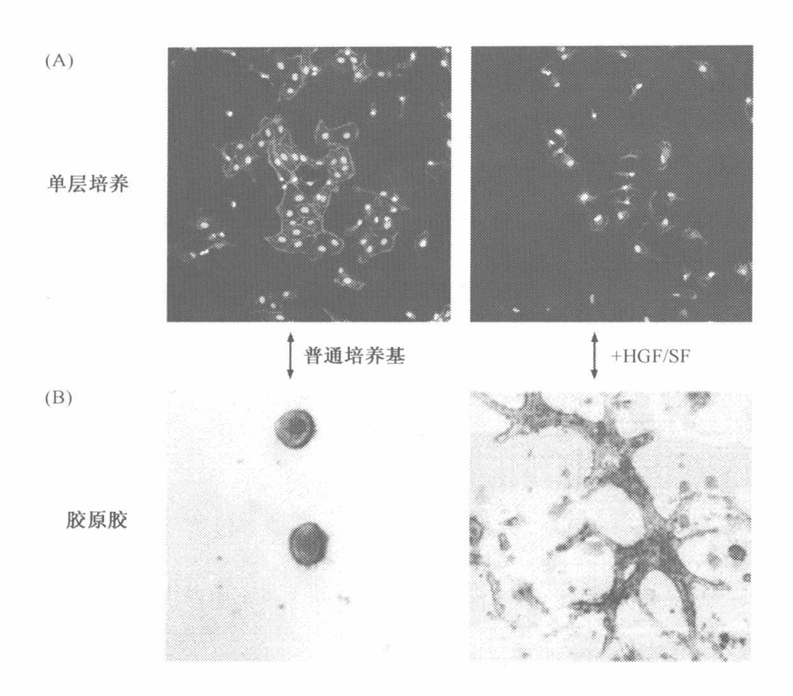


图 14.24 HGF 诱发的细胞分散和侵袭行为 肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）是一种细胞分散因子（scatter factor，SF），可以由多种基质细胞产生，它通过上皮细胞表面的同源受体 Met 而发挥作用。(A) 这里显示的是 MDCK（Maden-Darby canine kidney）细胞（胞浆染为红色），它广泛用于上皮细胞生物学的研究。左图是正常培养的细胞，右图是在培养基中加入 HGF/SF 后的细胞。在正常单层培养条件下，MDCK 细胞具有鹅卵石样形态并成簇生长。但是，当用 HGF/SF 处理后，细胞运动能力增强，并向多个方向分散。(B) 当 MDCK 细胞被接种到胶原胶中，细胞呈现小球形（左图）。但是，给予 HGF/SF 处理并继续培养一段时间以后，细胞侵入周围的胶原胶中（右图）。(A，courtesy of J. H. Resau；B，courtesy of U. Schaeper，from M. Rosario and W. Birchmeier，Trends Cell Biol. 13：328-335，2003.)

上述证据表明，肿瘤细胞获得恶性表型，包括诱发 EMT，并不仅仅是由细胞的基因组 DNA 决定的。细胞表型转换通常是肿瘤细胞基因组中特定等位基因的突变（如 *ras* 癌基因）和周围组织微环境中的间质信号，特别是肿瘤上皮和周围反应性基质交界处的间质共同决定的。在多种肿瘤中，这种交互信号的传递由反应性间质分泌的特定因子（如 TGF-β 和 TNF-α）所介导（图 14.25）。但其他间质信号，如前面提到的 EGF 和 HGF，同样可以引起一些与肿瘤细胞侵袭性和 EMT 有关的改变。许多肿瘤中都有这些现象，这里就不一一描述了（补充材料 30 ◎）。

综上所述，长期以来我们一直认为肿瘤细胞的表型是由其基因型决定的，而肿瘤细胞的生长基本上是一种细胞自治现象。肿瘤和正常细胞之间的异源性相互作用（第 13 章）多少改变了这一观点，使我们认识到肿瘤细胞在很大程度上依赖于间质中各种正常细胞的支持。现在，我们必须承认肿瘤细胞微环境可以从根本上重塑细胞表型，特别是

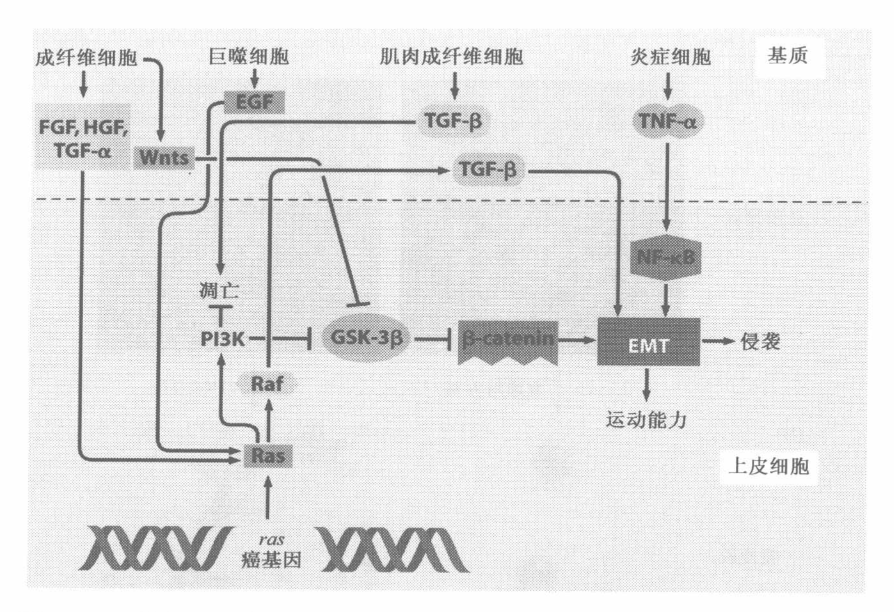


图 14.25 激发 EMT 信号 这张图高度概括了使上皮细胞发生部分或完全 EMT 的间质信号通路。看起来在正常情况下，EMT 是由肿瘤细胞接受到的大量的间质信号和细胞内信号（如这里提到的 *ras* 癌基因）共同协调的结果。但这些间质信号的精确组成和它们的作用方式目前仍然不清楚。

诱导细胞生物学行为的改变，包括 EMT。

14.5 胚胎发育过程中关键转录因子引发 EMT

整个 EMT 过程的完成有赖于几十个甚至上百个基因表达水平的改变。这些改变影响了细胞生物学行为的很多方面，这里不能一一列举，但至少包括细胞中间纤维细胞骨架的组装、细胞运动、细胞与邻近细胞的相互作用、蛋白酶的释放，甚至包括细胞表面的整联蛋白和生长因子受体表达水平等方面（表 14.2）。虽然大量的证据表明基质信号是激发肿瘤细胞发生 EMT 现象的关键因素，但是目前还没有直接的证据揭示这些信号如何配合反应性的上皮细胞，从而发生复杂的 EMT 现象。

早期发育遗传学在很大程度上回答了这一问题。大量的基因具有多效性，而且 EMT 诱发转录因子已经发现，这些研究大部分都是在黑腹果蝇中进行的。许多这样的基因和转录因子在脊索动物中都是保守的，而且它们在青蛙和小鼠的早期胚胎发育过程中控制着关键性步骤。这些步骤涉及各种类型的 EMT 现象（这些基因的高度保守说明 EMT 和早期胚胎发育中的关键步骤很早就在后生生物进化系统中建立起来，远在后生生物各门分散之前）。由于这些转录因子的激活，肿瘤细胞启动了复杂的、多成分的 EMT 程序。

至少发现了 6 种参与 EMT 的转录因子，当在特定的上皮细胞中异位表达这些转录因子中的任何一个，都能诱发 EMT 现象（表 14.3）。例如，Snail 是一个在果蝇中发现的这类转录因子（图 14.26），包括脊椎动物、昆虫、蠕虫和软体动物在内的多种后生

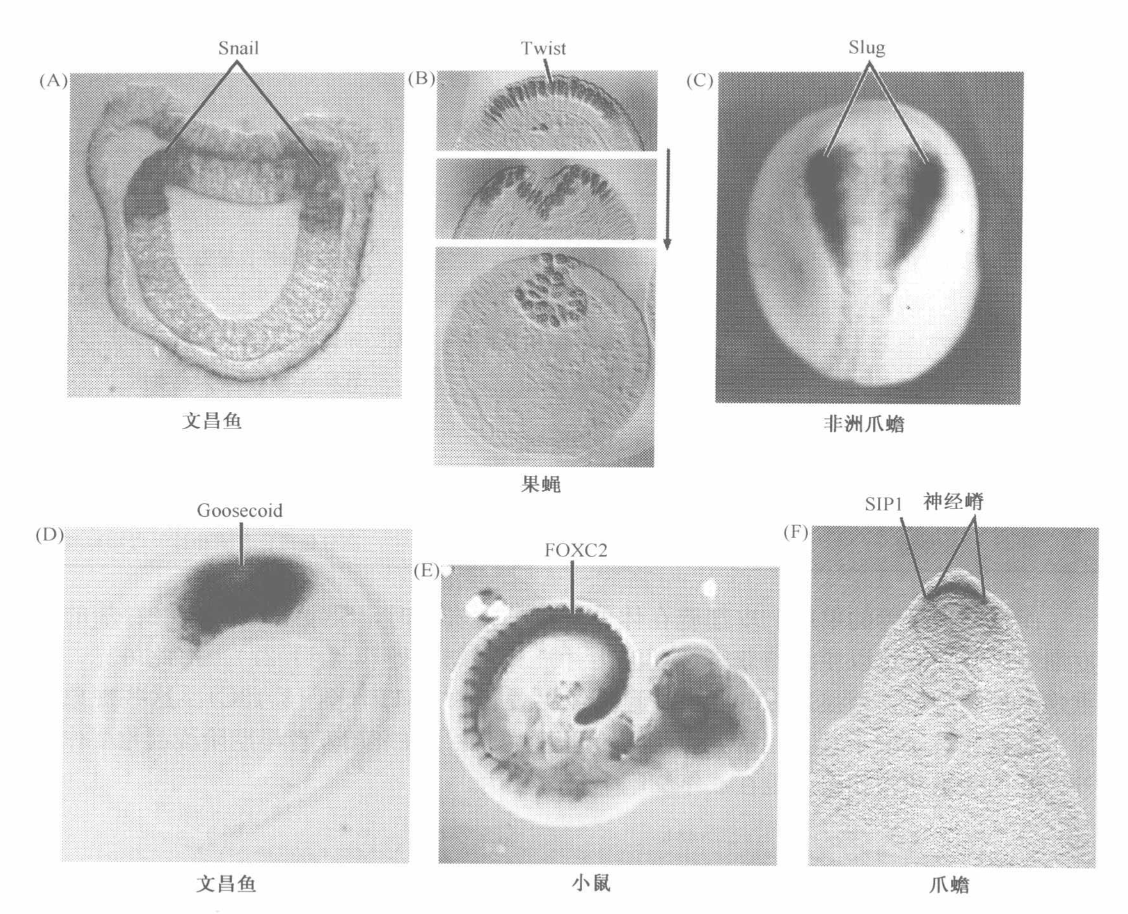


图 14.26 诱导 EMT 的胚胎性转录因子 (A) 转录因子(transcription factor,TF)Snail 能够诱导 EMT。这里显示的是低等脊索动物文昌鱼的胚胎,图中标示的部位(黑色区域)相当于高等脊索动物中发育成神经嵴的细胞。(B) 转录因子 Twist 同样可以诱导 EMT。其在果蝇早期胚胎原肠胚形成部位表达(棕色区域)。(C) 转录因子 Slug 是一个与 Snail 紧密相关的转录因子,它同样在神经嵴细胞表达。图中显示了它在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)胚胎细胞中的表达情况(蓝黑色)。(D) 转录因子 Goosecoid 在脊索动物原肠胚阶段的胚孔唇表达。这里所示的是由 TGF-β 信号通路诱导的 Goosecoid,在受精 8h 后的文昌鱼早期胚胎中胚孔附近细胞处表达。(E) 转录因子 FOXC2,以前又叫做中胚叶叉头-1(Mesenchyme Forkhead-1),在 9.5 天龄的小鼠胚胎中重要的中胚叶结构表达,包括发育中的脊柱和体节附近的中胚叶细胞,它们将发育形成大部分的肌肉组织。(F) 在爪蟾胚胎中,转录因子 SIP1 在神经嵴和神经管细胞表达。因此,它可能促进细胞运动,导致神经管的封闭和神经嵴细胞向身体其他部位的迁移。(A, courtesy of J. Langeland; B, from M. Leptin, J. Casal, B, Grunewald and R. Reuter Dev Suppl. 22-31, 1992. © The Company of Biologists; C, courtesy of C. LaBonne; D, from A. H. Neidert, G. Panopoulou and J. A. Langeland, Evol. Dev 2: 303-310, 2000; E, from T. Furumoto, N. Miura, T. Akasaka et al., Dev Biol. 210: 15-29, 1999; F, from L. van Grunsven, C. Papin, B. Avalosse et al., Mech. Dev. 94: 189-193, 2000.)

生物中都发现有 Snail 的表达。在脊椎动物的早期胚胎中,Snail 首先在一部分外胚层细胞表达,这部分细胞随着原肠胚的形成逐渐发育成中胚叶。Snail、Slug 和 Twist 在胚胎发育过程中的表达都可以使上皮细胞转变成可迁移的间质细胞并形成中胚叶。Snail

及其相关的 Slug 还参与一些其他的胚胎发育步骤，这些步骤都涉及一种组织向另外一种组织的转变。

表 14.3 参与 EMT 现象的转录因子

名称	首次发现的部位	转录因子类型	与肿瘤的相关性
E47/E2A	与 E-钙黏素启动子结合	bHLH	
FOXC2	间叶细胞形成	翼状螺旋/叉头	基底细胞样乳腺癌
Goosecoid	青蛙的原肠胚	配对的同源异型结构域	各种肿瘤
SIP1	神经发生	双臂锌指/同源异型结构域	卵巢癌、乳腺癌、肝癌
Slug	鸡的神经嵴分层和早期中胚叶	C2H2 型锌指	乳腺癌细胞系、黑色素瘤
Snail	果蝇的中胚叶诱导；脊椎动物的神经嵴迁移	C2H2 型锌指	浸润性导管癌
Twist	果蝇的中胚叶诱导；神经嵴迁出细胞	bHLH	乳腺浸润性小叶癌、弥散性胃癌、高分化黑色素瘤和神经母细胞瘤

而且，当培养的单层上皮细胞在体外进行划痕实验时，Slug 在划痕边缘存活的上皮细胞中诱导表达以使细胞获得运动能力并迁移到划痕处（图 14.27）。由此可见，为重建上皮细胞层，划痕边缘的上皮细胞要经历短暂的 EMT（图 13.13C）。这些现象加深了对这些转录因子及其正常生理功能的理解，即除了在胚胎发育早期阶段起重要作用外，它们为重建损伤组织也在成年细胞中瞬时表达。

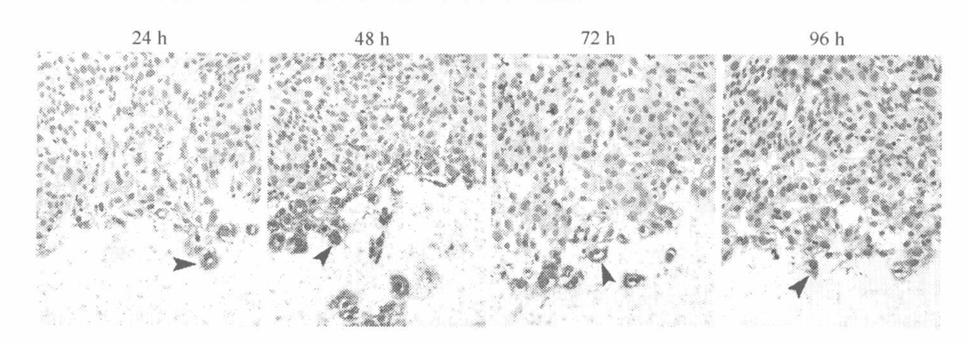


图 14.27 创伤愈合组织中诱发 EMT 转录因子瞬时表达 单层角化细胞的划痕实验中，转录因子 Slug 被暂时性的诱导表达。如图所示，创伤后 48h，为了重建完整的单层细胞，划痕边缘表达 Slug 的角化细胞（深棕色）从单层细胞中迁出，开始弥补划痕（每一个图的底部）。到 96h 时，大部分细胞停止表达 Slug，细胞形成了连续性的单层。(Courtesy of P. Savagner, L. Hudson, and D. Kusewitt.)

Snail 和 Slug 是 C2H2 型锌指转录因子家族的成员。从已有的研究结果来看，Snail-Slug 主要充当转录抑制因子，比如这两个因子都可以抑制 E-钙黏素基因的表达。正如前面提到的，E-钙黏素的表达下降本身就可以引起上皮细胞发生多种 EMT 相关的表型改变。

研究发现，化学致癌物诱发的小鼠皮肤癌侵袭前缘细胞表达转录因子 Snail，而且，在人类乳腺癌中，它的表达水平与淋巴结转移程度具有明显的相关性。同时，胚胎期

中，Snail 及其相关的转录因子 Slug 和 Goosecoid 可以被某些基质信号，如 TGF-β 和 Wnts 诱导表达。而已知这两种基质信号都可以诱发小鼠肿瘤细胞的 EMT。转录因子 Twist 在果蝇胚胎发育过程中的原肠胚形成阶段表达（图 14.26B），在脊索动物胚胎中，它在神经嵴迁出的神经上皮细胞表达，其表达水平同样被 TGF-β 信号所诱导。

目前，迅速积累的实验证据表明，这些转录因子与各种类型的人类恶性肿瘤相关。例如，在人类乳腺导管细胞癌中，Snail 在 E-钙黏素缺失表达的癌巢细胞表达。在人类乳腺癌中，发现 Slug 抑制 E-钙黏素的表达（图 14.28A）。在多数浸润性乳腺小叶癌病例中，都存在 Twist 的表达上调，这一现象同时也存在于浸润性导管癌中，只不过表达程度稍低（图 14.28B）。与此类似的是，Twist 主要在弥散性胃癌中高表达，而在肠型

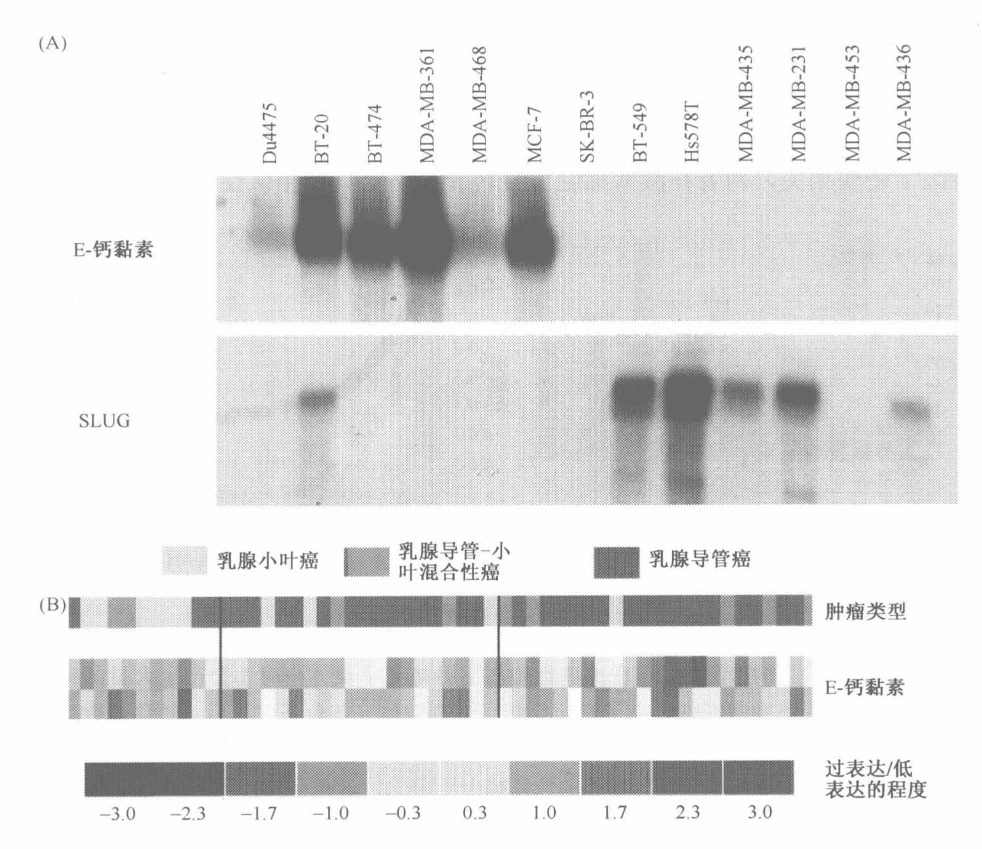


图 14.28　人类肿瘤中表达诱发 EMT 的胚胎性转录因子　目前有些证据表明，大量的胚胎性转录因子在人类肿瘤细胞中可以诱发 EMT（并与 E-钙黏素的缺失表达相关）。（A）多个人类乳腺癌细胞系的 mRNA 转录本表达分析表明，Slug 在不表达钙黏素的肿瘤细胞系中表达；反过来，表达钙黏素的细胞一般都没有 Slug 的表达。两个蛋白的负相关表达模式很可能是因为 Slug 与钙黏素启动子区的 E 盒序列结合，从而抑制这一关键性的上皮细胞基因表达。（B）表达芯片结果表明，人类乳腺癌病例中 Twist 的表达与钙黏素的表达呈现负相关性。因为在培养细胞中，Twist 对 CDH1 基因的表达抑制率有 250 倍之多，所以，它可能是造成钙黏素 mRNA 表达缺失的主要原因，而后者在高侵袭性的乳腺小叶癌中表达明显缺失，而在低侵袭性的导管癌中仍然具有一定水平的表达。（A，from K. M. Hajra，D. Y. Chen and E. R. Fearon，Cancer Res. 62：1613-1618，2002；B，from J. Yang，S. A. Mani，J. L. Donaher et al.，Cell 117：927-939，2004.）

胃癌中表达量稍低，后者高表达另一种 EMT 转录诱导因子 Sip1。分析三种 EMT 诱导性转录因子 SIP1、Snail 和 Twist 的 mRNA 表达水平，结果表明，弥散性胃癌中高表达 Snail 和 Twist，同时表达 N-钙黏素这一间叶细胞标志物。而在肠型胃癌中（其与弥散性胃癌在病因和生物学行为上都明显不同），高表达 SIP1。而其他的转录因子，或者表达被抑制，或者与正常胃黏膜组织具有相同的基线表达水平。这些证据表明，EMT 诱导性转录因子以不同的组合在不同类型的人类肿瘤中，促进细胞的侵袭性生长。而且更为重要的是，Twist 和 Slug 的高表达都可以明显增强细胞对凋亡和失巢凋亡的抵抗力，保护转移细胞免受一些不良的生理性应激因素，从而使它们能成功地到达远处组织并形成转移灶。

这些相关性还没有得到系统的研究，还不能断定各种转录因子是引起人类肿瘤细胞侵袭和转移性状的原因。尽管如此，目前的研究结果提示一旦这些转录因子中一个或多个在肿瘤细胞表达，它们便可以单独或协同作用，引起细胞发生一系列侵袭和转移表型改变（图 14.29；图 14.15）。还应当注意，胚胎性 EMT 现象和这些参与肿瘤发生发展的转录因子密切相关，两者在激活细胞信号转导通路上具有相似性（图 14.30）。

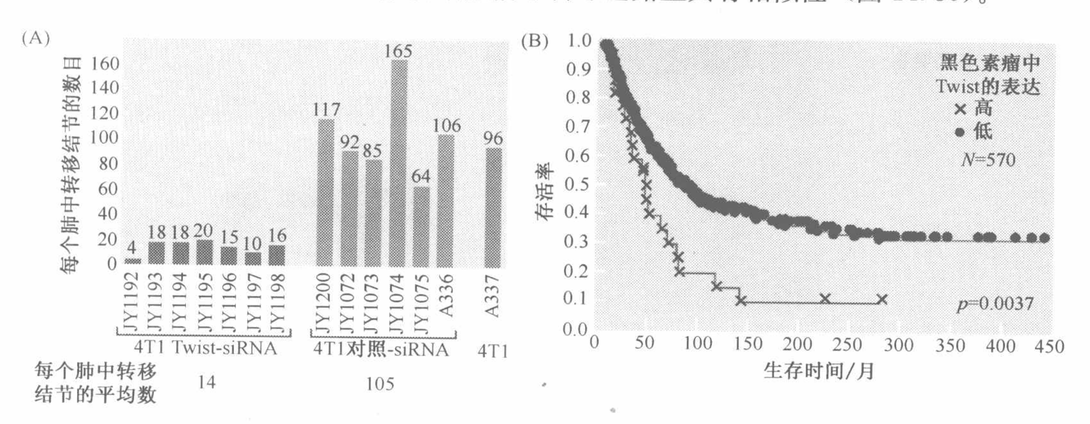


图 14.29 胚胎性转录因子与肿瘤进展 目前还没有直接的证据支持各种胚胎性转录因子引起人类恶性肿瘤进展。（A）当把小鼠 4T1 乳腺癌细胞皮下种植到小鼠体内时，会产生大量的肺转移灶（最右侧紫色条柱）。当肿瘤细胞转染了对照反转录病毒载体（蓝色条柱）后，转移灶数目没有发生明显变化。然而，当转染 Twist-siRNA 反转录病毒载体（引起 Twist mRNA 的降解）后，对原发性肿瘤的生长没有明显影响，而转移灶的数目减少约 85%（红色条柱）。更为明显的是，形成转移灶（红色条柱）的细胞都持续表达高水平的 Twist，表明这些细胞源于 Twist mRNA 表达没有被完全抑制的原发性肿瘤细胞。每一个条柱代表一只荷瘤小鼠。（B）通过免疫组织化学染色分析一组黑色素瘤患者的 Twist 表达水平。Kaplan-Meier 图显示，组织中表达高水平 Twist 的患者比起那些低表达或仅表达基线水平 Twist 者具有更加不良的预后。（A，from J. Yang，S. A. Mani，J. L. Donaher et al.，Cell 117：927-939，2004；B，from K. Hoek，D. L. Rimm，K. R. Williams et al.，Cancer Res. 64：5270-5282，2004.）

对上面这些促进肿瘤细胞侵袭性转录因子的描述，联想到前一章关于反应性基质及其对肿瘤细胞致瘤性影响的讨论，都涉及 E-钙黏素、EMT 现象和 TGF-β 等。从这些联系可以有趣地推测：也许原发性肿瘤形成和细胞获得侵袭性并不像许多肿瘤学研究描述的那样，是两个独立的、截然不同的事件。虽然这两个事件从概念上很容易划分，但

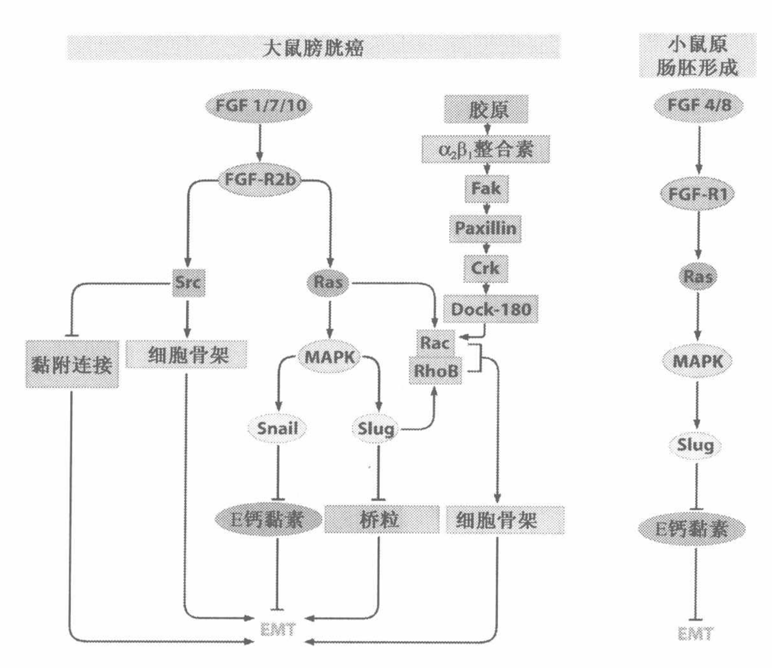


图 14.30 胚胎发育期和肿瘤进展期 EMT 信号的相似性 大鼠膀胱癌模型中负责活化 EMT 的信号级联（左图）和小鼠胚胎发育中原肠胚形成早期 EMT 信号级联（右图）具有惊人的相似性。这一结果表明，侵袭性肿瘤细胞中的 EMT 现象是一种重新激活的潜在的细胞生物学进程，而在正常情况下这一进程在哺乳动物胚胎发育早期被激活。（From J. P. Thiery, Nat. Rev. Cancer 2：442-454，2002.）

在真实的生物学世界是完全不同的。夸张一点说，肿瘤细胞的侵袭性很可能是起始多种原发肿瘤形成的细胞转化过程的延续。因为转化和侵袭性同样依赖于多种调节环路和效应蛋白，它们也许是一个统一体，同时又相互交叉。

综上所述，诱导 EMT 现象转录因子的发现至少表明三个与恶性肿瘤进展相关的重要概念。首先，多种恶性细胞表型都可以由非遗传性改变，即基质来源的异源性信号所诱导，而不仅仅取决于肿瘤细胞本身的遗传性改变；其次，肿瘤细胞不需要拙劣地修补所有与高度恶性相关的表型，取而代之的是，由于这些转录因子的表达并发挥多种多样的作用，许多恶性表型随之产生；另外，因为这些转录因子表达并导致依赖于基质异源性信号的 EMT 现象，原发性肿瘤细胞一旦离开原发灶在新的基质微环境中着床，如那些潜在的转移灶位点，它们会重新从间叶细胞状态回到上皮细胞形态。

14.6 细胞外蛋白酶在侵袭中的关键作用

上皮细胞至间叶的转化（EMT）代表了癌细胞获得侵袭能力的复杂生物学过程。为了正确认识这一过程，需要深入剖析一些重要的效应分子，比如能够产生 EMT 相关表型的蛋白。首先，恶性细胞最显著的特征是具有侵袭邻近细胞层的能力。这种行为需要癌细胞重塑周围的组织微环境，在细胞外基质中开辟道路并推开其他细胞。导致这些复杂改变的最重要的效应分子是基质金属蛋白酶（MMP）（表 13.1）。在肿瘤中被募集

的间质细胞主要是巨噬细胞、肥大细胞和纤维细胞，这些细胞分泌大量的蛋白酶，而不是癌细胞本身（图 14.31）。

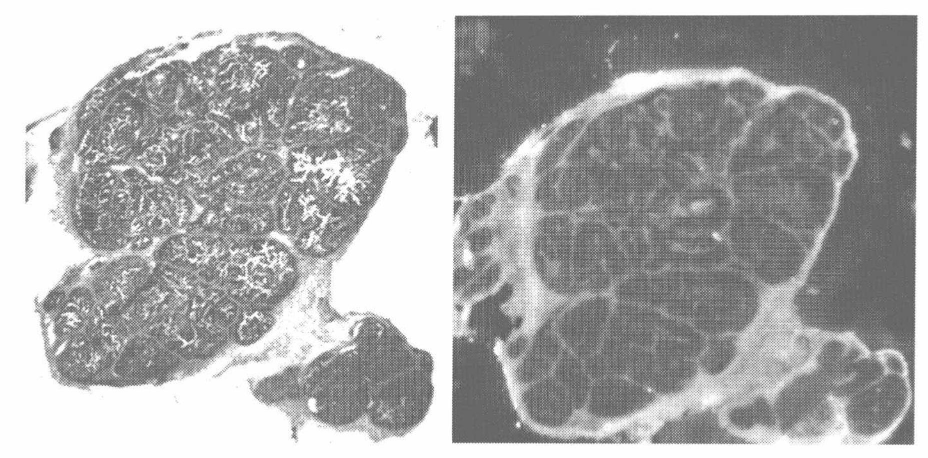


图 14.31 肿瘤相关细胞分泌基质金属蛋白酶 MMP 主要由炎症细胞和间质中的纤维细胞产生。在 MMTV 多瘤转基因鼠的乳腺癌中，通过检测 MMP 裂解合成底物，使其释放聚阳离子脂质荧光标签而证明其存在，标记物能迁移至邻近细胞，从而产生荧光信号。苏木素和伊红染色（左图）显示肿瘤被蛋白水解酶降解产生的光圈（右图），表明在蛋白降解的产物中包含着间质细胞。（Courtesy of E. Olson，T. Jiang，L. Ellies，and R. Tsien.）

通过溶解组织中包绕细胞周围厚厚的基质分子，MMP 为细胞的移动创造了空间。被 MMP 降解的 ECM 组分包括纤维蛋白原、黏蛋白、层粘连蛋白、胶原及蛋白聚糖等。在降解 ECM 组分的进程中，MMP 还可以动员和激活特定的生长因子，这些生长因子最初以非激活的形式包绕在 ECM 或细胞表面。

膜型-1 MMP（MTI-MMP）是 6 种细胞膜锚定的 MMP 类型之一，因此只能裂解邻近细胞合成的底物蛋白。在人基因编码的 187 个不同的基质金属蛋白酶中，28 个是分泌型 MMP。与细胞膜结合酶 MT1-MMP 不同，它们是细胞间隙间的可溶性酶类。MT1-MMP 可以裂解细胞表面黏附分子，如钙黏素、整联蛋白、生长因子受体和细胞因子等。它还可以裂解失活的**酶原**，如使前-MMP-2 转变成有酶活性的 MMP 分子。

已知这些分泌的蛋白酶在正常细胞的生存和增殖中扮演重要角色。正常组织细胞在每一次细胞生长和分裂周期中，必须开拓 ECM 中子细胞的所占空间，一旦两个子细胞形成，每个细胞必须反过来重塑自己周围新的 ECM 环境，这个过程在分裂活跃的组织中连续发生。因此，活化的 MMP 和其他的细胞外蛋白酶，如尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂（uPA），伴随并参与正常细胞的增殖，而这不仅仅是在肿瘤细胞内才表现出的异常现象。特定 MMP 抑制剂的临床实验已经被禁止，原因在于它们同时抑制了软骨和其他关节组分的正常更新和代谢，产生无法忍受的关节僵硬和疼痛。

每种类型的 MMP 通常都具有其特定的底物谱（表 13.1），以高度调控和局限的模式发挥作用。在肿瘤细胞侵袭过程中这些酶可能具有底物特异性。但是此时，蛋白降解的方式似乎持续进行而不是像正常细胞生长和分裂过程中那样短暂的激发。

几个研究比较清楚的胚胎性转录因子（14.5 节）促进 EMT 进展的主要原因之一就

是促进癌细胞合成并释放 MMP（主要是 MMP-2 和 MMP-9）。已知大量的 MMP 来源于肿瘤细胞的基质。例如，广泛研究的基质金属蛋白酶 MMP-9，主要由肿瘤侵袭前缘的巨噬细胞、粒细胞、成纤维细胞表达（13.5 节），MMP-9 在这些细胞前缘的阳性表达与原发癌的侵袭能力有关，表明这类 MMP 能够引起几个阶段侵袭转移的级联反应，包括原发瘤的局部侵袭、内渗和外渗等。体外实验表明 MMP-9 能够降解胶原，特别是胶原 W、V、XI 和 X1M。胶原是 ECM（包括基底膜）的关键组成部分。MMP-9 降解的其他底物包括层粘连蛋白（基底膜另一种重要组成部分，图 13.5）、趋化因子、纤维蛋白原和潜在性 TGF-β1。后两者经 MMP 切割后，由静息型转变为活化型。

MMP 广泛变化的功能表明其酶活性至少在正常组织中必须受到严密的调控。如同 caspase（9.13 节）一样，可溶性的 MMP，如 MMP-9，只有被其他蛋白剪切后才具有活性，这一事实反映了调控的必要性。一类称为组织金属蛋白酶抑制物（tissue inhibitors of metalloproteinase，TIMP）的蛋白也具有负调控作用，TIMP 结合 MMP 后，使其转变成非活化型构象（13.9 节）。同时，一些细胞外蛋白酶活性通常局限在某些不连续的位置上，即**伪足体**（podosome），该处细胞膜锚定的 MMP，特别是 MT1-MMP 在造成蛋白水解的区域处于高度活化状态（图 14.32）。

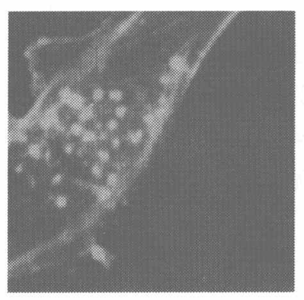
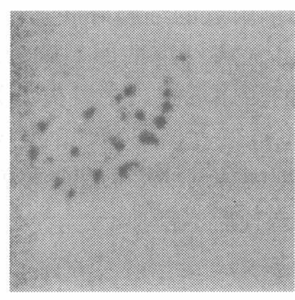
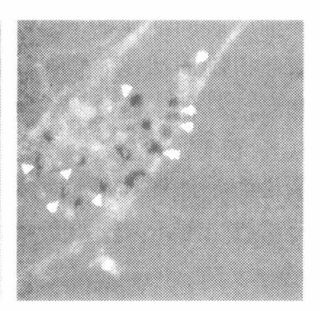




图 14.32　伪足体和细胞外基质的局部降解　伪足体是细胞表面小的局部突起，许多类型细胞具有这一结构并用其降解最邻近区域的细胞外基质（ECM）。癌细胞直接利用伪足体控制侵袭前沿的 ECM 降解。因此，在本文中它们有时被称为“侵袭体”。如用荧光染料 phalloidin 标记细胞内的肌动蛋白纤维（红色，左图），显示出与伪足体相关的不连续的肌动蛋白簇，它们位于 src 转化小鼠成纤维细胞的侧面（下方）。这些细胞在偶联 FITC 染料的纤连蛋白（中图，绿色）表面生长，可见伪足体的下方，由伪足体相关蛋白酶，如 MT1-MMR 造成的不连续的空洞（黑色）已经形成。伪足体相关的肌动蛋白簇和纤连蛋白的侵蚀空洞重叠处在右图中由白色箭头标识（From K. Mizutani，H. Miki，H. He et al.，Cancer Res. 62：669-674，2002.）

虽然 MMP 已经被认为是侵袭和转移特定步骤中的直接效应者。但是，这种降解作用通过何种机理导致细胞在多步骤癌变过程，包括侵袭转移的级联过程中不断进展尚不清楚。在转基因小鼠乳腺组织中异位表达 MMP-3（也称为 stromelysin-1），可引起乳腺增生（图 14.33），其中有些细胞最终发展为癌，并导致侵袭和转移。这一模型揭示了 MMP 调控的重要性以及在正常组织中密切调控 MMP 功能的必要性。

MMP 活化调控网络的复杂性可以进一步通过一种非 MMP 类蛋白酶——**尿激酶纤溶酶原**激活剂（urokinase plasminogen activator，uPA）的生物学行为来说明。uPA 以

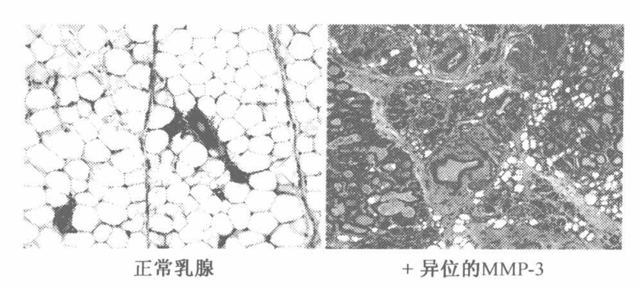


图 14.33 MMP-3 的异位表达与乳腺癌进展 正常的小鼠乳腺（左图）由静止的导管（紫色）和大量的脂肪组织组成（白色，充满脂肪细胞）。但是，在特定于乳腺上皮细胞组成性表达 MMP-3 的转基因小鼠中，乳腺过度增生（右侧），包括形成增生细胞岛，导管化、纤维化的导管上皮细胞（紫色），胶原富集的间质（浅蓝色），异常的脂肪细胞（白色卵圆形结构，右下方），许多这类区域以后进展为侵袭转移性肿瘤（未显示）。(From M. D. Sternlicht, A. Lochter, C. J. Sympson et al., Cell 98: 137-146, 1999.)

酶原的形式由间质细胞分泌，这种形式的 uPA 能够与上皮细胞（包括恶性细胞）表面的自身受体（称作 uPAR）结合，从而具有催化活性（图 14.34）。上皮细胞可利用这些锚定于细胞表面活化的 uPA 切割附近的细胞外底物。其中，很多其他的细胞外蛋白水解酶借此机制而活化。例如，uPA 将纤溶酶原裂解为纤溶酶，产生活性蛋白酶，继而裂解和激活其他细胞外蛋白酶的酶原形式，主要类型为基质金属蛋白酶（MMP）1、2、3、4、9 和 14。此外，uPA 也可以直接切割和活化某些 MMP。因此，uPA-uPAR 复合体的抑制剂能够抑制动物模型中肿瘤的生长和转移就不足为奇了。另外，血清中高水平的可溶性 uPAR 提示肿瘤患者预后不良。

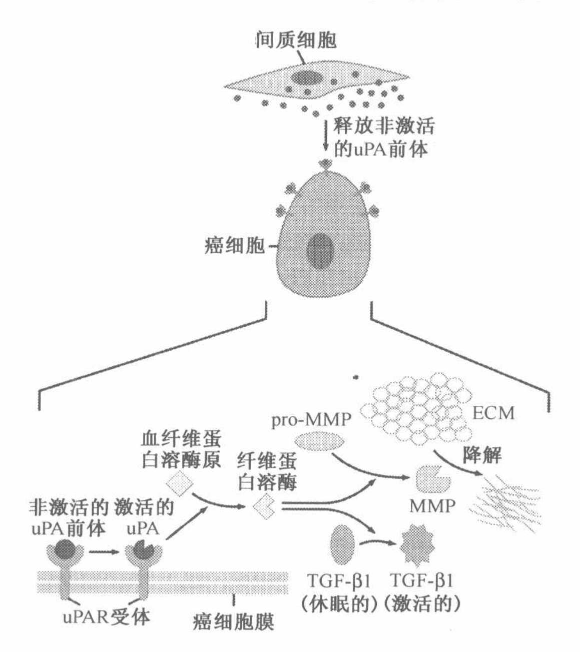


图 14.34 uPA、uPAR 和细胞外蛋白的激活 无活性的尿激酶纤溶酶原（pro-uPA）被间质细胞释放，一旦释放，结合其同源受体 uPAR，上皮细胞的表面具有 uPAR；这种结合使 uPA 转变为具有催化活性的蛋白酶。活化的受体结合 uPA 能把无活性的、可溶的纤溶酶原转变为有活性的纤溶酶；后者具有蛋白酶的功能，剪切酶原形式的基质金属蛋白酶（pro-MMP）成活化的 MMP，还可以使潜伏的 TGF-β1 转变为活性形式。同时，有证据表明 uPA 可直接将 pro-MMP 转变为活性蛋白酶。（From F. Blasi and P. Carmeliet, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3: 932-943, 2002.）

这些对蛋白酶及其促进癌细胞侵袭的简单介绍仅仅描述了蛋白水解酶和底物之间高度复杂相互作用网络中的一小部分。哺乳动物细胞合成的蛋白酶数目是巨大的，它们与

第6章描述的高度复杂的网状系统中的蛋白功能互相拮抗。目前，仅研究了少部分蛋白酶与癌症发生发展机理之间的关系（补充材料 31 ◎）。

14.7 小 Ras 样 GTP 酶对细胞黏附、形态和运动的调控

细胞外蛋白酶，特别是 MMP 的作用，在生物化学水平上解释了侵袭的癌细胞如何清除前进道路上的细胞外基质及组织障碍。但单个癌细胞如何通过清除后的道路前行，即细胞迁移能力的机理尚不清楚。人们已深入研究了体外培养细胞的运动行为，认为其在固体表面的运动能力反映了癌细胞在体内侵袭临近细胞层及血管内渗的生物学行为。这种运动能力对于癌细胞脱离血管或淋巴管，外渗到周围组织是非常重要的。

培养细胞暴露于各种生长因子后能诱导细胞运动（这些生长因子除了具有促有丝分裂原活性外，有时还被称为促运动因子）。对于上皮细胞，运动诱导能力最强的因子通常是肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF），它能够诱导单层培养细胞向各个方向运动，又称为分散因子（scatter factor，SF）。大部分上皮细胞表达 HGF 的受体——Met，许多细胞在 HGF 作用下获得运动能力（图 14.24A）。同样，EGF 也能诱导乳腺癌细胞运动（见图 14.23B）。

在分子水平上，细胞对促动力信号的应答以及发挥运动引擎功能的细胞学机制非常复杂。细胞运动过程不但涉及细胞不同部位的肌动蛋白骨架的连续重构（图 14.35），还包括迁移细胞和细胞外基质（ECM）间的黏附和解黏附过程（对于培养的细胞，ECM 是铺在细胞下方、培养皿表面的蛋白质网络）。

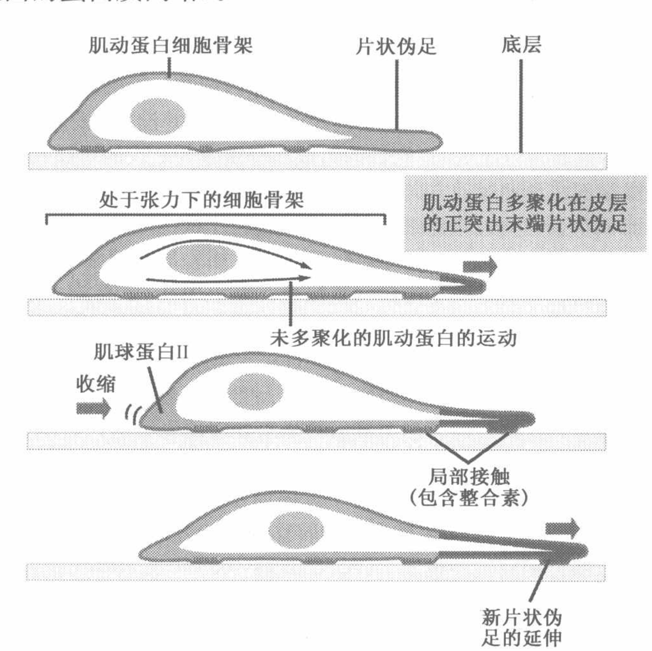


图 14.35 固体附着层上的细胞移动 培养细胞的移动依赖于细胞骨架的一系列复杂改变和其与下方固体表面局部接触点的不断形成和解离。为了向前行方向伸出片状伪足，细胞不断调整和重组肌动蛋白纤维，并形成新的局部接触点。同时，在局部接触点解离的地方，应力纤维，包括肌动蛋白负责收缩细胞后缘部分。局部接触的形成和解离（红色）依赖于各种整联蛋白分子在细胞膜表面的定位调节以及其与细胞外基质（ECM）成分（用黄色底层表示）的结合力。(From B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

细胞运动过程可以分为几个不同的步骤。首先，细胞的胞浆向运动方向延伸。这一延伸过程包括从细胞表面隆起宽而扁平的薄片样**片状伪足**，这一结构有十几微米宽，但只有 0.1～0.2μm 厚（图 14.36）。同时，细胞表面蛋白酶，如 MMP 等，选择性地降解

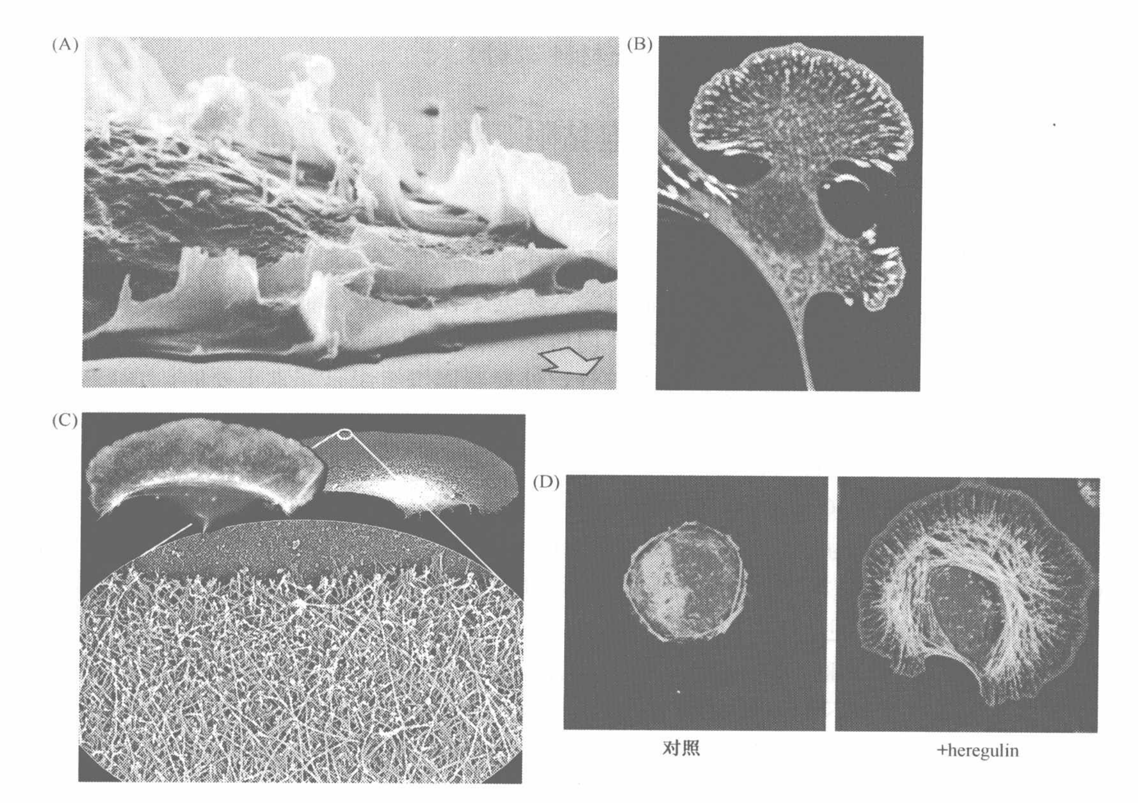
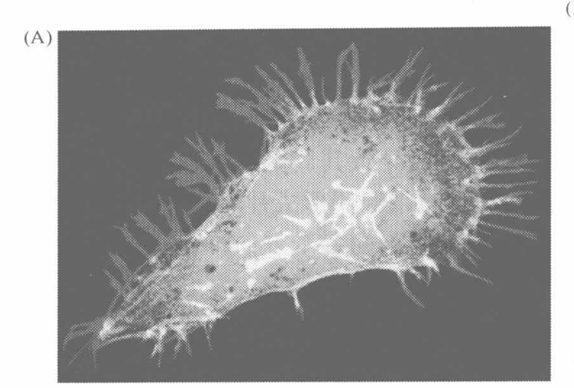
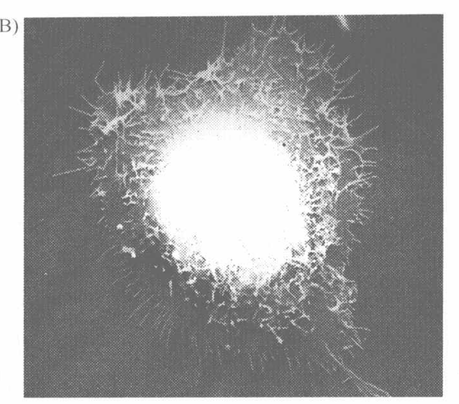


图 14.36 片状伪足 (A) 扫描电镜照片 (scanning electron micrograph, SEM) 显示自发转化的大鼠肝细胞表面精细皱褶结构——片状伪足，在细胞移动过程中它使细胞沿着前行方向运动（箭头所指方向）。人们推测片状伪足在体内侵袭的癌细胞前进过程中扮演重要角色，但还没有直接的证据支持。伸展到细胞运动前缘的片状伪足并没有黏附到附着表面，它们似乎以皱褶的方式向细胞背侧折返（上方）；它们的组成部分重建为更大的质膜和细胞骨架。(B) 荧光显微照片显示成纤维细胞在预期运动方向上形成的片状伪足结构。用荧光染料 phalloidin（红色）标记肌动蛋白纤维，而 Ena 蛋白通过重建细胞局部接触点和片状伪足的外缘而调节其前进方向，通过其融合表达的绿色荧光蛋白 (GFP) 而得到标记。(C) 相差显微镜显示具有明显片状伪足结构的鱼角膜细胞，图中突起处主要是肌动蛋白（蓝绿色，左上图）。更高放大倍数的电镜照片显示这一细胞（右上图）和其细胞骨架（下图），具有一个高度致密交织的肌动蛋白纤维网络，这种结构的形成有助于在细胞运动的方向上形成片状伪足。(D) 片状伪足的形成和其导致的细胞运动可被多种生长因子及其相应的酪氨酸激酶受体所激活。在人类乳腺癌细胞中加入 erbB2/erbB3 受体的配体 heregulin 后可以观察到这种效应。左图显示的是未处理的癌细胞，右图为 heregulin 作用 20min 后的癌细胞。肌动蛋白骨架用绿色荧光 phalloidin 标记，而细胞核染成蓝色（因为 heregulin 均匀的加入周围的培养基中，这个细胞被诱导向各个方向而不是朝向一个方向形成片状伪足结构）。增强的 erbB2 信号 (HER2/Neu) 与人乳腺癌细胞转移进展能力相关。受体介导的片状伪足形成及其相关的细胞运动可以部分解释这种现象。(A, courtesy of Julian Heath; B, from J. J. Loureiro, D. A. Rubinson, J. E. Bear et al., Mol. Biol. Cell 13: 2533-2546, 2002; C, from T. M. Svitkina, A. B. Verkhovsky, K. M. McQuade and G. G. Borisy J. Cell Biol. 139: 397-415, 1997; D, courtesy of A. Badache and N. E. Hynes.)

(A)



(B)



(C)

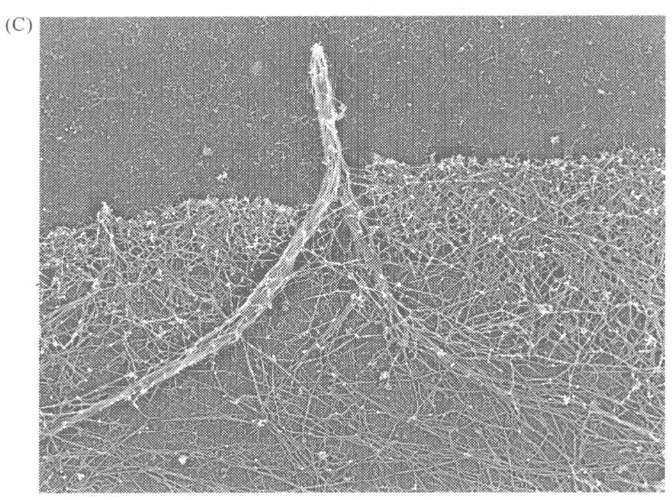


图 14.37　丝状伪足　(A) 从细胞表面伸出的丝状伪足（橘色麦芒状突起），允许侵袭细胞探索细胞外环境。这种情况下，通过表达 Cdc42 相互作用蛋白——Zizimin 而促进丝状伪足内肌动蛋白纤维的组装。(B) 片状伪足的前端通常是散布的丝状伪足，它们以某些难以理解的方式充当迁移细胞的传感器。图中显示细胞向各个方向伸展的片状伪足和丝状伪足，因此没有单一方向的迁移“前缘”。(C) 为了能在片状伪足的前缘形成丝状伪足的突起，丝状伪足内的肌动蛋白纤维朝向细胞迁移方向紧密成束分布。(A，courtesy of W. B. Kiosses and M. A. Schwartz；B，courtesy of M. Cayer，L. Lim and C. A. Heckman；C，courtesy of E. Bulanova；see also T. M，Svitkina，E. A. Bulanova，O. Y. Chaga et al.，J. Cell Biol. 160：409-421，2003.)

迁移方向细胞前缘的 ECM 蛋白。在此过程中，细胞在迁移前缘的 ECM 和片状伪足之间重新部署整联蛋白分子，以形成新的黏附点，同时细胞后缘的黏附结构解离，由此解离胞浆和质膜将其重新部署到迁移细胞前缘。

细胞表面的片状伪足和被称作丝状伪足的麦芒状突起结构，能使细胞不断向前扩展(图 14.37)。如同片状伪足一样，丝状伪足的形成也是通过肌动蛋白纤维重新组装而成。每一丝状伪足的细胞膜下都有紧密排列成束分布的肌动蛋白纤维，而丝状伪足在癌细胞侵袭中扮演的确切角色还有待阐明。

细胞的形状和运动过程由 Rho 蛋白家族的一组 Ras 相关蛋白调控。在第 6 章中已经简要讨论过的 Rho 蛋白像 Ras 蛋白一样，也可进行两相转换，当结合 GTP 时处于活化状态，当 GTP 水解成 GDP 时处于失活状态。人类细胞中已经发现了 20 多个 Rho 蛋白家族成员。它们分为三个亚家族——Rho 蛋白、Rac 蛋白和 Cdc42。像 Ras 蛋白一样，大多数 Rho 蛋白家族成员的 C 端具有脂类基团，使其能够锚定在细胞内膜上。而每一成员在细胞形状和运动过程中具有特化的作用。

小 GTP 酶 Rho 蛋白家族成员由 Rho、Rac 和 Cdc42 亚家族组成，它们控制肌动蛋

白骨架和黏着斑的形成。通过特异性针对 vinculin 的抗体染色来显示，vinculin 是细胞骨架与黏着斑的整联蛋白分子之间的连接蛋白（图 5.28）。肌动蛋白纤维用高亲和力的 phalloidin 荧光素标记。血清饥饿静止状态的成纤维细胞 3T3 作为对照。细胞暴露于特异性激活 Rho 亚家族蛋白的溶血性磷脂酸后，导致细胞构建大量的应力纤维和黏着斑结构。向细胞中显微注射具有组成性活性的 Rac 蛋白导致其周围形成单一巨大的片状伪足（相反，局部的 Rac 激活信号可能仅在朝向刺激来源侧形成片状伪足）。向细胞中显微注射 Cdc42 鸟苷酸转换因子（GEF）造成一个细胞向各个方向伸出成千上万的丝状伪足。实际上此前在一个重要方面误导了各种 Rho 蛋白的行为，即它暗示每一成员在肌动蛋白骨架构象改变的全过程中均发挥作用。事实上，它们的作用各不相同。细胞运动的复杂过程依赖于这类蛋白的每一成员在胞浆内很小范围的局部激活，并依次促进细胞作为整体向一个方向或另一个方向移动。而整体激活的结果是促进细胞同时向各个方向移动，如图 14.36D 片状伪足所示，它在细胞完整的胞浆周围形成连续的环状结构（Rac 功能的整体激活是通过显微注射引入突变的具有组成性活性的 Rac 蛋白引起的）。

生长因子激活的酪氨酸激酶受体信号导致 Rho 蛋白家族 G 蛋白多个成员的活化。例如，用血小板源性生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）处理培养的成纤维细胞（PDGF 是这类细胞的潜在有丝分裂原），可激活多种 Rho 蛋白，刺激成纤维细胞在培养皿底部移动。相反，当成纤维细胞在胶原胶上三维培养时，PDGF 诱导细胞侵袭。三个 Rho 蛋白亚家族（Rho、Rac 和 Cdc42）似乎都促进侵袭，而只有 Rac 蛋白在培养的成纤维细胞沿固体表面运动过程中是必需的。这些不同的行为表明 Ras 蛋白与其他 Rho 家族成员间存在明显区别：在癌细胞中，Ras 蛋白通常通过结构改变激活（更具体地说是氨基酸替换），而各种 Rho 蛋白成员被上游的生理性调节因子功能激活。

PDGF 受体和这些 Rho 家族蛋白成员之间具有的信号传递机制还不清楚。但是已知这一受体通过激活 Ras，活化其下游至少 3 个效应蛋白（包括 Raf、Ral-GEE 和 PI3K）（磷脂酸肌醇-3 激酶）信号通路（见 6.5、6.6 和 6.7 节）。另外，激活的 Ras 似乎还激活 Tiaml，而它是 Rac 的鸟苷酸交换因子（GEF 可使小 G 蛋白，如 Ras 和 Rho 与 GDP 解离，结合 GTP，从而激活 G 蛋白信号通路）。因此，Tiaml 也可以认为是 Ras 蛋白的另一个效应蛋白。

事实上，从细胞运动的角度来说，PI3K 是 Ras 蛋白最重要的效应蛋白。通过产生磷脂酸肌醇（3，4，5）三磷酸（PIP3），PI3K 使细胞质膜的胞浆面发生化学结构改变，从而使多种胞浆蛋白通过 PH 结构域与之结合（6.6 节）。这些蛋白包含许多鸟苷酸转换因子（GEF），它们负责激活 Rho 家族的 G 蛋白成员。当 Rho-GEF 锚定于质膜后发生活化。PI3K 和 PIP3 在细胞运动的功能可以通过盘基网柄菌（*Dictyosteliurn discoideurn*）黏菌细胞的研究来解释。PI3K 的产物，PIP3 定位于前行的黏菌细胞前缘。相反，作为 PIP3 的失活剂和 PI3K 的拮抗剂，PTEN 定位于细胞的边缘和后缘。这使我们重新思考：生长因子受体，如 PDGF 受体，可以激活 PI3K 信号，这一过程受细胞内定位的影响。

最初 Tiaml 被认为是 T 细胞淋巴瘤侵袭转移基因，提示它所编码的蛋白在肿瘤进展晚期阶段发挥重要作用。似乎 Tiaml 与 GTP 激活的 Ras 和 PIP3 结合以后，能活化 Tiaml 的功能。通过激活 Rac 蛋白，Tiaml GEF 促进迁移细胞前缘肌动蛋白的局部多聚

化，从而形成对细胞的运动至关重要的片状伪足结构（图 14.36C）。

Rho-GEF 激活的其他类 Rho 蛋白，在细胞运动过程中发挥多种功能。例如，Rho 蛋白（如 RhoA 和 RhoB），与 Rac 蛋白作用相似，促进细胞前缘和细胞外基质间形成新的黏附点。反之亦然：形成新的黏着斑也促进 Rac 活化，提示其在细胞连续前移中发挥自我维持和正反馈环路作用。Rac 和 Cdc42 蛋白也能诱导一些分泌蛋白酶的表达，主要是上一节中描述的基质金属蛋白酶。因此，它们共同定位于迁移细胞前缘的片状伪足并重塑细胞外基质。

细胞体的收缩（将帮助细胞推动滞后端向前缘方向移动）对细胞的定向运动同等重要。这种收缩主要被 Rho 亚家族成员调控。通过促进胞浆中的肌动蛋白成束分布，Rho 蛋白能够产生所谓的“应力纤维”结构（图 14.35），从而调节胞浆的收缩性。目前 Rho 家族中共发现 22 个不同的鸟苷酸交换因子。这种复杂性可能取决于细胞接收特定生理信号时，不同胞浆微结构域需要激活不同的 Rho 蛋白所致。为了准确控制细胞运动过程，这些 Rho 蛋白的活化受精确的时间和空间调节。

Cdc42 代表第三类 Rho 样蛋白亚家族，它具有特殊的功能，即诱导形成指状丝状伪足（图 14.37）。这种伪足如何控制细胞运动目前还不清楚。另外，激活的 Cdc42 能够促进细胞运动，而不依赖于对伪足的特定影响。

更为复杂的是 Rho、Rac 和 Cdc42 在不同类型细胞中的作用也不相同。如在正常上皮细胞（不是上面讨论的成纤维细胞），Rac 和 Rho 亚家族蛋白负责维持 E-钙黏素依赖

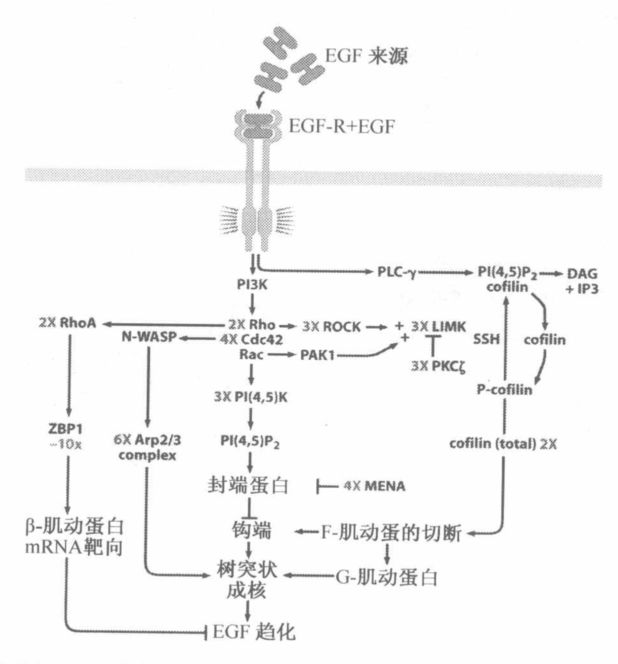


图 14.38　EGF 诱导细胞运动的环路　许多位于 EGF 受体下游的信号转导蛋白，负责介导 EGF 诱导的细胞运动过程。乳腺癌细胞中相当比例的这类蛋白表达水平改变，使细胞获得更强的运动和侵袭潜能。癌细胞中特定蛋白过表达在图中用粉色数字表示，而表达下调的程度用绿色数字表示。某些蛋白，如 cofilin，作为细胞特定区域的肌动蛋白纤维，而封端蛋白防止其过度延伸。这些信号蛋白的作用在 6.6 节讨论。(From W. Wang，S. Goswami，E. Sahai et al.，Trends Cell Biol. 15：138-145，2005.)

性细胞间黏附连接，这些连接对保持上皮细胞的片层结构、固定上皮细胞至关重要。但是，在转化的上皮细胞，如发生了部分或完全EMT转换的结肠癌细胞中，Rac促进细胞的运动。在不动的细胞内，Tiam-1（Rac转换因子）在黏附连接中定位，而在迁移的细胞内，Tiam-1定位于片状伪足和相关的膜皱褶处。

将这些不同的观察结果整合成为一张模式图的工作才刚刚开始。图14.38做了初步尝试，它描述部分EGF受体下游信号环路和EGF刺激的细胞运动之间的关系。事实上，所有在这个图中描述的环路都可能参与被其他生长因子，如HGF和PDGE刺激的细胞运动。

Rho蛋白家族成员与肿瘤转移的关系已通过寻找在转移的癌细胞中特异表达而在非转移细胞中明显低表达的基因而得以深入阐述。在一组实验中，选择具有高转移潜能的小鼠和人黑色素瘤细胞系与低转移潜能的细胞进行比较。在高转移细胞高表达的基因中，包括编码RhoC蛋白的基因（Rho亚家族成员之一）。事实上，将RhoC表达载体转入低转移乳腺癌细胞中能增强其转移能力，而异位表达显性负突变形式的RhoC则可降低转移细胞的转移能力（图14.39）。RhoC也在炎性乳腺癌和胰腺癌细胞中高表达，炎性乳腺癌是一种特殊的侵袭性乳腺癌，而胰腺癌通常也具有高度侵袭性。

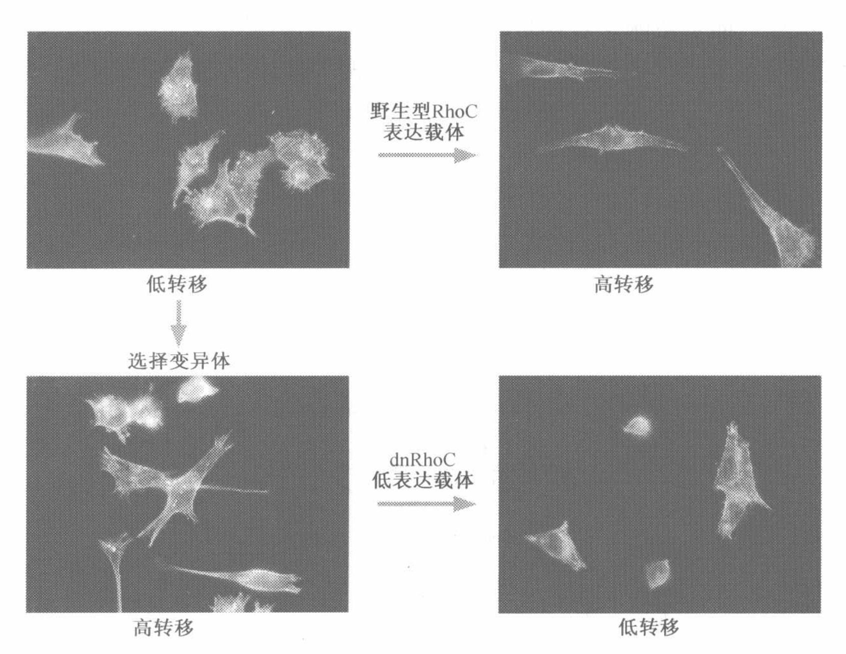


图14.39　RhoC对转移的影响　同一来源的人黑色素瘤细胞具有不同转移潜能的两种变异体，高转移细胞具有更强的运动和侵袭能力。转移能力可以通过小鼠尾静脉注射肿瘤细胞和肺转移灶计数进行评估。这种方法可以评估侵袭和转移级联中的某些步骤（如血管外渗）而非全部过程。低转移细胞（左上）表现为上皮细胞形态，而高转移潜能的细胞（左下）表现为成纤维细胞样形态。将高表达野生型RhoC的反转录病毒载体转染到低转移细胞后，细胞（右上）表现出拉伸的成纤维细胞样形态并具有高转移能力。相反，将显性负突变形式的RhoC转入高转移潜能细胞，其更具上皮细胞形态，失去大部分体外运动和侵袭能力。（From E. A. Clark, T. R. Golub, E. S. Lander and R. O. Hynes Nature 406：532-535，2000.）

在正常非侵袭性大鼠肝癌细胞、转化的 NIH 3T3 细胞和低转移潜能的黑色素瘤细胞中，异常高表达 RhoA 基因，可增强细胞的转移能力。比较侵袭（转移）和非侵袭的人 T24 膀胱癌细胞的差异基因表达谱，发现了一个已知的 Rho 蛋白活性拮抗分子 RhoGDI-2，它在侵袭性细胞中的表达几乎消失。

依然不知道培养的癌细胞运动性研究能在多大程度上反映它们在活体组织中的行为。然而，似乎细胞在体内和体外的运动行为都与类 Rho 蛋白的调控网络有关，它们调节细胞形状、黏附和细胞外基质附近蛋白的局部水解。在恶性肿瘤细胞中，这些细胞功能对侵袭和转移行为至关重要。也许最使人困惑的是这一信号转导通路的复杂性：人类基因组序列分析的结果提示大约 20 个 Rho 蛋白家族成员被 80 多种不同的鸟苷酸转换因子调控（即 Rho-GEF）。

14.8 转移的细胞可通过淋巴道从原发瘤播散

迁移细胞在侵袭后，进入血管或淋巴管系统（即血管内渗过程），随后分散，在恶劣的旅途中生存下来，最终在远离原发瘤的组织定居。肿瘤细胞通过血液循环转移的过程称为血道播散，这依赖于原发瘤的血管生成。这里需要强调的是，血管生成在两个重要方面使癌细胞受益，即支持细胞代谢活性的需要有利于细胞生存和增殖；此外为肿瘤细胞进入血液并向全身播散敞开了大门。

14.1 节深入讨论了血道播散，清楚地表明血液循环在此过程中的重要作用。淋巴道在癌细胞播散中的作用不是很明显。几乎体内所有的组织内都有淋巴管道，它们负责细胞**间隙液**的排泄（信息栏 13.5 和补充材料 26 ◎ ）。大部分腹部器官的淋巴液回流到心脏附近的左锁骨下静脉，从而进入体循环。因此，淋巴管的癌细胞有时通过这一交叉连接进入体循环。

癌细胞和其募集的基质可以分泌 VEGF-C，它促进淋巴管生成并形成新的淋巴管道（13.6 节）。而且，分泌高水平 VEGF-C 的实验肿瘤，会在附近的引流淋巴结（与肿瘤所在组织引流淋巴管相关的淋巴结）中播种更多数量的转移癌细胞（图 14.40A）。但是，对自发性肿瘤详细的组织学分析提示肿瘤团块中很少发现功能性淋巴管。相反，它们大多数位于实体瘤的外围区域。在肿瘤中心区域很少发现淋巴管，而且它们通常已经塌陷闭塞（图 13.35）。像上一章讨论的，因为淋巴管道的静水压很小，它们看起来无法抵抗扩张肿块的压迫从而塌陷。

肿瘤团块淋巴管的功能缺失一定会影响转移癌细胞脱离原发瘤的路径。由于不能进入淋巴管，多数癌细胞被迫使用肿瘤团块中更多的、功能性的毛细血管，把它作为逃逸路径。尽管入口有限，有些癌细胞还是成功地进入淋巴系统。在某些特殊的乳腺癌中，有些转移的癌细胞直接进入引流乳腺的淋巴管道，并在下游的淋巴结附近汇集（图 14.40A）。由于和附近的淋巴细胞形态明显不同，这些游走的癌细胞在淋巴管道和淋巴结中很容易被检测到（图 14.40C）。它们表达上皮细胞蛋白，如角蛋白，而此类蛋白通常在淋巴组织中不表达（图 14.40D）。组织学上，常通过检测引流淋巴结来评估原发性乳腺癌是否已经发生了远处器官的转移（信息栏 14.6）。

信息栏 14.6　淋巴结是具有携带重要预后价值信息的前沿哨所　淋巴结及相应淋巴管引流并收集来自相应组织的亚细胞碎片及脱落细胞。另外，在淋巴结中免疫细胞被抗原激活。这解释了为什么要常规检查与不同的器官（如乳腺，图 14.40A）关联的引流淋巴结来确定癌细胞是否已经从原发瘤释放。例如，初次诊断时，大约 1/3 的乳腺癌、结直肠癌和口腔癌患者在原发瘤附近的淋巴结中已经发现了转移性癌细胞（图 14.40C 和 D）。因此，这些引流的淋巴结可以作为体内存在转移癌细胞的早期预警信号。在区域淋巴结中，直接引流原发瘤的单个淋巴结称为“前哨淋巴结”（图 14.40B）。带有少量受累淋巴结的乳腺癌患者通常播散较为局限，不会发展为转移性疾病。而那些具有多个受累淋巴结的患者发生机体远处器官播散的可能性要大得多。例如，一项研究发现，不同类型肿瘤的长期生存者中，90％的个体可以检测到 1 个、2 个或有时候 3 个的淋巴结转移。而那些在原发瘤切除后发现大于 5 个转移淋巴结的患者中，只有不到 5％的患者能够享有长期的无病生存。

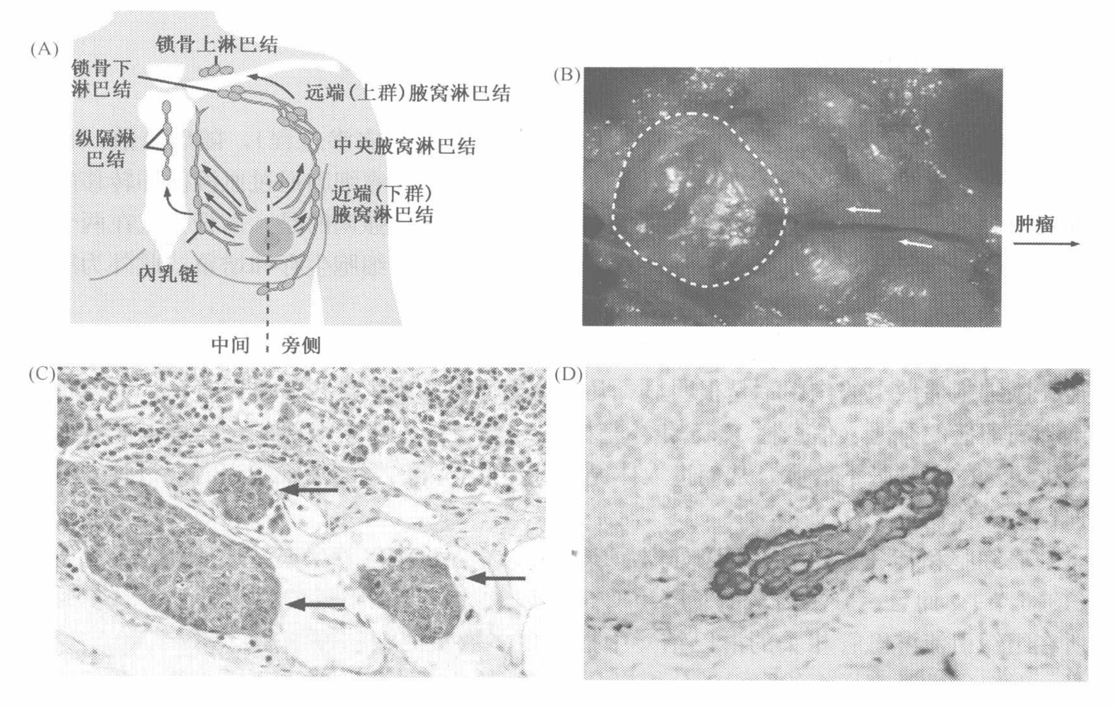


图 14.40　乳腺淋巴结引流　（A）由于收集流经乳腺各个部分的淋巴液（箭头），引流乳腺的淋巴管（红色）和淋巴结（沿管道膨大的部分）成为转移播散的起始位点。来自乳腺不同部位的癌细胞倾向于在不同组群的引流淋巴结中沉积。在人类乳腺癌初次诊断时，超过 30％的患者已经发生了淋巴结转移，表明转移性癌细胞可能已在身体远处器官沉积，特别是在引流淋巴结中发现大量的乳腺癌细胞以后，这种可能性更高。（B）在所有的乳腺引流淋巴结中，前哨淋巴结（图 A）通常可以通过在肿瘤中注射蓝色染料（图片视野的右外侧）得以鉴定，而这些染料依次通过淋巴管（箭头）进入引流淋巴结（虚线的外侧，左）。（C）一个腋窝淋巴结的 HE 染色显示三个来自原发性乳腺癌的微转移灶（箭头），在淋巴结被膜（下面，未见）和内部的淋巴细胞团（小细胞，深染核，上方）之间生长，并将后者推向上方。（D）用针对角蛋白（褐色）的特异抗体行免疫组化染色显示前哨淋巴结中的微小转移灶。这个方法对于检出小的微转移灶比图 C 的 HE 染色更加灵敏。因为淋巴结中的间叶细胞中不表达角蛋白，而只有上皮细胞特异表达角蛋白。（A，B and C，from A. T. Skarin，Atlas of Diagnostic Oncology，3rd ed. Philadelphia：Elsevier Science Ltd.，2003；D，from J. P Leikola，T. S. Toivonen，L. A. Krogerus et al.，Cancer 104：14-19，2005.）

引流原发瘤的淋巴结在肿瘤分期方面也具有应用价值。一旦癌细胞在这些淋巴结内形成多发的微小转移灶，也就意味着某些肿瘤细胞可能已经播散至远处器官。事实上，自 20 世纪后，外科医生相信组织引流淋巴结的功能像滤器一样，当淋巴结内充满转移的癌细胞时，它们可能溢入其他的淋巴管，从而在机体中广泛播散。

还有观点认为引流的淋巴结是播散癌细胞的死路，也就是说，在这些淋巴结中增殖的癌细胞很少转移至远处器官。事实上，对乳腺癌、头颈癌、胃癌和结直肠癌的研究发现：手术切除引流淋巴结对患者的长期生存没有影响。这一观察结果表明淋巴道和血道转移是两个不同的过程，到达淋巴结的癌细胞通常不再继续转移。因此，淋巴结是转移的**有效标志**，为诊断和预后评价提供有用信息，但其并不直接参与肿瘤的广泛播散和转移性疾病的形成。

14.9 播散的癌细胞在特定器官形成转移灶取决于多种因素

前几章描述侵袭和转移播散的机制从总体方面解释了侵袭-转移级联的过程。而且似乎不同类型的侵袭和转移癌细胞受相同的机制决定，如在这里讨论的例子。然而更重要的是，我们讨论的内容还没有涉及侵袭和转移级联的最后步骤——克隆形成。

微转移灶（直径＜2 mm）生长成大转移灶（直径＞2mm）是形成转移疾病的关键步骤。例如，诊断为乳腺癌的 30％的患者骨髓中有成千上万的微转移灶，包括单个癌细胞或小的癌细胞团块（图 14.2C）。但其中仅有一半的患者最终由于大转移灶的形成而导致疾病复发。克隆形成是一个极端低效的过程，绝大部分细胞不能形成微小转移，不能很好地适应组织环境，因此不能形成大转移灶。

另外，很多类型的癌细胞在侵袭-转移级联的早期步骤中有类似的生物学行为，而不同类型的癌细胞克隆形成的方式相差很大。成功适应骨髓转移的乳腺癌细胞（这些细胞能在骨髓中形成克隆）与成功适应骨髓并克隆化的前列腺癌细胞间具有很多差异。另外，在骨髓成功克隆化的乳腺癌细胞需要发生的变化与在脑中或肺中形成大转移灶的细胞具有很大区别。

充足的证据支持转移的癌细胞在特定组织中形成克隆的能力具有高度特异性。① 75％的乳头状甲状腺癌患者伴随明显的淋巴结转移，但其中仅有 3％最终发生远处转移。因此，适应淋巴结转移的甲状腺癌细胞并不适应在体内其他组织形成转移。②同样，直径大于 1cm（包含 10^9 个细胞）的十二指肠癌具有高频率的淋巴结转移，但是很少发生远处转移至肝脏。而肝脏是结肠来源肿瘤的常见转移位点。③从人淋巴结转移灶分离的癌细胞，注射至鼠静脉系统，更倾向于在鼠的淋巴结中生长而不是在其他位置形成克隆。④手术切除孤立的、相对大的结肠癌的肝、肺转移灶有利患者延长无疾病进展生存期，尽管患者循环中携带较大数量的转移细胞（包括在一个或几个器官中具有克隆形成能力的细胞）。⑤鼠的黑色素瘤细胞优先在肺部形成转移，而乳腺癌易转移至肺和骨。这种不同的观察结果强化了我们的认识，即在特定器官形成克隆的能力是一种获得性的特化表现（信息栏 14.7）。

信息栏 14.7　癌细胞必须在转移的位点“学会”克隆　克隆形成能力的明确描述是指原发瘤内的癌细胞在具有致瘤性的同时尚未具备在一个或多个靶器官形成克隆的能力。对于大部分类型的癌细胞，克隆形成能力的获得似乎不依赖于致瘤性特征。这一点是讲得通的，因为原发瘤选择各种癌细胞在特定的微环境中增殖的方式，而不适用于远处不相关组织。

癌细胞何时何地学会形成克隆能力的争论依然没有答案。一些在原发瘤中的亚克隆细胞可能通过在获得致瘤潜能的同时偶然获得非选择性的克隆化能力。更常见的是，克隆形成的获得可能出现在转移形成的位置，大量的微转移存在一段时间，直至其中播散的细胞偶然获得克隆形成能力。对于这一点，达尔文选择学说明显支持这种细胞变异理论，因为它的后代细胞能够在远处地方旺盛的生长。但这个组织中其他微转移将逐渐消失。

另外一些因素也影响这些动力学过程：不同类型的癌细胞倾向于在特定组织形成克隆。转移的前列腺癌细胞在骨比在肝脏和胰腺更容易形成克隆。这提示正常前列腺上皮细胞的分化程序对癌细胞转移至特定的组织有很强的影响。如果我们把前列腺癌细胞和可能的靶向器官作图描述转移趋势（图 14.41），会发现前列腺细胞更容易到达骨髓，表明它们需要较少的改变适应这个地方。相反，它们不容易到达其他器官，在那里很少形成大的转移灶。

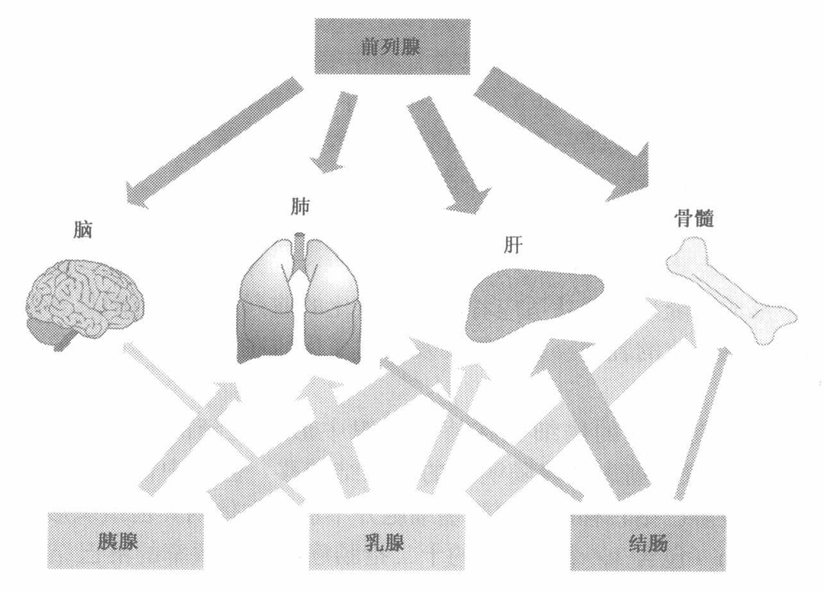


图 14.41　原发瘤及其转移定向性　图中相对宽的箭头提示临床上原发瘤转移器官的相对比，主要涉及四类肿瘤：前列腺、乳腺、胰腺和结肠癌。某些情况下，肿瘤转移的趋势反映了原发瘤细胞（形成克隆）适应远处组织微环境的能力，如前列腺癌和乳腺癌易于转移到骨髓。其他情况下，血液循环的特点强烈影响转移的位置，如原发结肠癌较易发生肝转移，可能因为癌细胞通过门脉系统直接引流至肝（图 14.43）。

在一个器官或另外器官形成大转移灶的偏好早在 1889 年英国病理学家 Stephen Paget（图 14.42）就有描述。他提出“种子-土壤”假说，他把癌细胞比喻成植物播散的种子。对 735 例乳腺癌患者的临床研究中，Paget 发现这些患者的转移形成模式既不能通过机体随机播散，也不能从乳腺血液循环的模式解释。因此他提出转移的癌细胞

（种子）仅仅在特定的适宜组织（土壤）中生存，即“植物播种，它的种子撒向所有的方向，但它们仅仅在适宜的土壤中生存和生长”。这种在特异的位置形成大转移灶的能力已被某些临床研究所阐明（补充材料 32◎）。

种子和土壤模式明确地提出播散的癌细胞在身体各部分均可播散。我们可以通过其他模式思考：许多类型的癌细胞在特定器官形成转移不是因为其直接迁移或归巢于某些组织，而是它们随机播散，仅仅当那些癌细胞碰巧落在适宜的组织中并成功生存，形成微转移，偶尔形成克隆和肉眼可见的转移。相反，本质相同的播散的癌细胞可能栖息其他组织的机会更大，但它们可能很快消失或不能在这些位点克隆化，形成微转移灶而存活。



图 14.42 Stephen Paget 英国内科医生 Stephan Paget 首次提出了“种子和土壤”假说，认为播散的癌细胞形成远处转移依赖于其到达的远处器官能否提供适宜于肿瘤细胞生长和存活所需要的环境。（From I. J. Fidler, Nat. Rev. Cancer 3：453-458，2003.）

种子和土壤的假说不能解释所有类型的人类恶性肿瘤（信息栏 14.8）。相反，某些情况下，转移到某些器官的偏好性可能与连接原发癌的血管和转移位置的布局相关。例如，结肠癌强烈转移肝的倾向恰恰反映了这些癌细胞通过门脉系统离开肠道（它连接的胃肠道和脾血供），癌细胞在短暂的旅途后，几乎总是定居在营养肝脏的毛细血管床（图 14.43）。甚至即使转移的结肠癌细胞以很低的效率在肝脏形成克隆时，肝脏捕获一定数量的癌细胞，确保足够的时间和足够数量的转移在特定靶器官形成。

信息栏 14.8 对侧转移相对罕见 “种子和土壤”学说面临最尴尬的地方可能是它不能解释对侧转移为什么较少发生。例如，癌细胞从一侧原发乳腺播散应该找到对侧乳腺（即相对的）提供最适宜克隆生长的微环境。事实上，同出现在乳腺外的转移相比，仅 2%乳腺癌患者出现对侧转移。同样，肾癌也很少在对侧出现转移。这种现象同“种子和土壤”学说的理论不相符，依然需要解释。

相同的逻辑可以解释乳腺癌为什么通常在肺部形成转移灶。同结肠癌细胞的转移一样，徘徊的乳腺癌细胞在肺部难以找到适宜它们生长的环境，单个癌细胞在肺部形成克隆的概率就很低。但是，有些转移会最终在那里形成，仅仅因为太多的细胞被物理性的截获在肺组织中（图 14.43）。这种逻辑提示转移至器官的概率一般由两个参数决定：转移的癌细胞被组织捕获的概率及癌细胞适应组织微环境并形成克隆的能力。

在某些特定病理过程，如局部损伤，本来不适合克隆形成的组织变得适宜克隆形成（补充材料 33◎）。这提示癌患者机体内的慢性炎症可能有时会成为适宜转移癌细胞生存的微环境，并为它们提供一系列的促分裂和营养信号，如 13 章中讨论的。

还有其他理论用来解释癌细胞转移的**组织选择性**。例如，靶器官释放特定化学因子。化学趋化因子有时又称为化学因子，它们可能募集循环中散在的癌细胞。这种趋化

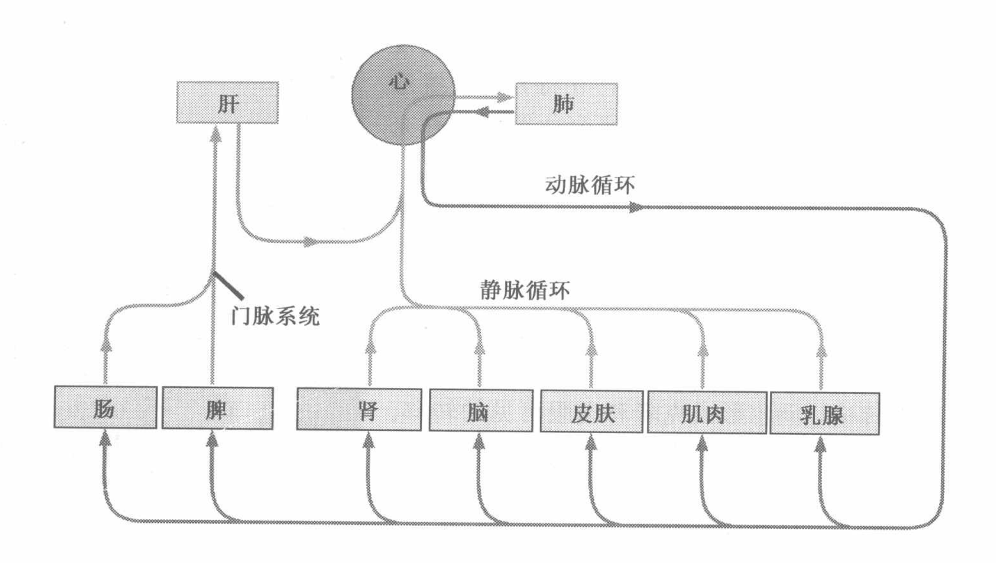


图 14.43　门脉循环和肝转移　大部分组织中的静脉血流入右心，最后进入肺毛细血管床，脾和肠的引流不同，因为它们通过门脉循环直接排空至肝脏（经过肝脏后，静脉血回到心脏）。结果，大部分转移的结肠癌细胞在离开结肠后立即被肝脏毛细血管床捕获。（Adapted from I. C. MacDonald，G. C. Groom and A. E Chambers，BioEssays 24：885-893，2002.）

作用可以保证循环中的各种免疫细胞回归特异的组织以行使自身正常免疫系统的功能。在一组实验中，当 B16 鼠黑色素瘤细胞异位表达 CXCR4 化学因子受体时，它转移到肺的能力增强了 10 倍。当用表达 CXCR7 受体的载体转染黑色素瘤细胞时，显示出明显增强的淋巴结转移能力，这一机制正是正常淋巴细胞归巢至淋巴结的机制（事实上，由于这些化学因子激活的受体通常为癌细胞提供促有丝分裂和生存信号，很难确定当受体被配体激活时，是否诱导转移的细胞迁移至组织或仅仅在细胞迁移至组织后促进这些细胞的生存和增殖）。

根据其他的定向转移模型机制，各种组织中形成的毛细管血管床（即血管网络）在管腔面表达组织特异性分子。这些分子为特定表达的黏附分子（如整联蛋白）在癌细胞表面形成特定的锚定位点。这种模型有时被称为“血管**邮政编码**”理论，因为它表明不同的组织内血管的腔面在化学形式上具有特定的归巢地址，类似于邮递系统。但这种模式没有考虑到癌细胞通常被血小板团包围，这些血小板能阻止癌细胞和内皮细胞之间的相互作用。

一个详细研究人癌细胞转移行为的研究计算 66%的转移可被原发癌和可观察的转移位点之间的血液流动模式来解释。在 20%的情况下，靶组织特异的微环境（而不是血流模式）似乎可以解释为什么特定类型的癌细胞易于在某些组织中形成肉眼可见的转移灶。最后在 14%情况下，负性相互作用（组织似乎主动排斥游离的癌细胞）可以解释一些实际转移少于血液流动模式预测转移的原因。

总之，各种不同的观察提示转移的细胞播散至机体内许多组织器官，这种播散受血

管系统布局的影响。一旦癌细胞到达不同的位点，癌细胞通常在可提供特异的化学因子、营养因子和分裂素的组织中最终形成克隆。然而在一些情况下，这些细胞能成功地在不适宜栖息的组织场所形成肉眼可见的转移，仅仅是因为血液循环使大量的癌细胞到达这些位点。

14.10 骨转移破坏了成骨细胞和破骨细胞的功能平衡

对于骨转移的认识，代表了目前已知的促使转移癌细胞在特定组织微环境快速生长的生物化学和生物学机理。这一事实本身体现了详细讨论**促骨转移**的必要性。此外，正如反复强调的，西方最常见的几种肿瘤（包括肺癌、乳腺癌和前列腺癌）都表现出明显的骨转移倾向。实际上，晚期乳腺癌和前列腺癌患者往往都发生骨转移。这些癌症患者去世后的尸检结果显示，大量的转移癌细胞通常分布于全身的骨骼中。

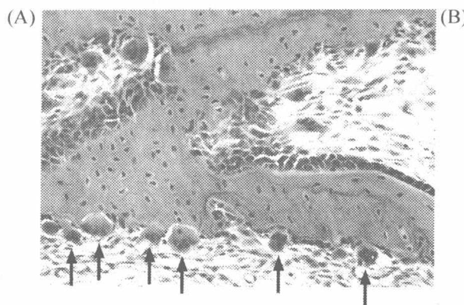
我们通常认为骨骼是静态的组织，骨一旦形成会在机体的生命过程中保持自身的结构。但事实并非如此，对于哺乳动物来说，每年约有占骨重 10%的骨骼发生更新，每 10 年骨骼就经历一次彻底的更新。这种持续的重塑使骨骼可以通过增强局部受累区域的代谢方式对机械应激产生反应，如腿骨骼持续重构便是腿骨不同区域接受的承重信号产生的应答反应。

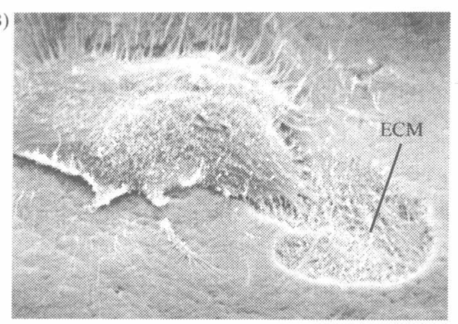
骨的不断更新是由**破骨细胞**和**成骨细胞**协同完成的，前者可以破坏矿物化的骨骼，后者负责重建骨骼。破骨细胞的功能首先是对骨骼**去矿物化**（溶解磷酸钙晶体），接着是降解新暴露的作为磷酸钙晶体沉积支架的细胞外基质（图 14.44）。随后成骨细胞很快移至骨溶解部位重建骨骼，这一过程包括新细胞外基质的组装和磷酸钙晶体在新基质间隙中的沉积。

大部分类型的转移癌细胞本身不能重塑骨骼结构。相反，它们操纵并利用骨组织的这两类细胞改变骨骼形态。所以，乳腺癌细胞激活破骨细胞导致了溶骨性转移，即引起骨溶解的转移。然而，前列腺癌细胞往往是激活成骨细胞，产生成骨性损伤。在这种情况下，矿物化的骨组织聚集在转移灶附近（图 14.45）。

实际上，这两种生物学行为代表了骨代谢平衡的两个极端，因为这两种类型的骨转移性癌都或多或少地同时激活成骨和破骨细胞。例如，虽然晚期乳腺癌患者以溶骨性转移为主，但是大约 1/4 患者的骨骼也可见明显的成骨性损伤。同样，前列腺癌导致的成骨性损伤中偶尔也可见破骨性转移损伤。除了骨髓瘤以外［骨髓瘤是 B 细胞（可分泌抗体）肿瘤，只能产生溶骨性损伤］，其他肿瘤的骨转移灶都可见这两种类型的骨转移。

成骨细胞和破骨细胞的紧密合作是通过（至少部分通过）生长因子信号的交换介导的。RANK（NF-κB 受体激活因子）配体，简称 RANKL，是破骨细胞的一个重要诱导因子。RANKL 是由成骨细胞合成的，分布于细胞的表面。当表达 RANK 受体的破骨细胞前体与成骨细胞表面的 RANKL 分子接触时，会导致破骨细胞表面 RANK 受体的活化以及破骨细胞前体成熟为功能性的破骨细胞（图 14.46）。另外，成骨细胞可合成一种可溶性的诱饵受体，称为 osteoprotegerin（OPG），它可以结合 RANKL，抑制破骨细胞前体表面的 RANKL 分子的活化。结果阻断了 RANKL-RANK 信号通路，抑制





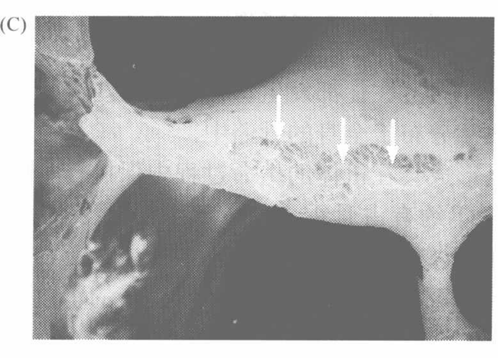


图 14.44 破骨细胞介导的骨降解 (A) 这张显微图片显示破骨细胞（紫色，见箭头指示处）在小鼠下颌骨的表面（粉色）正在挖掘出一小凹陷。(B) 在更高的放大倍数下，扫描电镜显微照片显示一个大鼠的破骨细胞已在矿化的骨骼表面挖掘出一浅凹陷。骨骼的磷酸盐晶体已被破骨细胞分泌的酸性物质溶解，结果在凹陷底部可见富含胶原的细胞外基质构成的筛网结构。这些细胞外基质附着分裂素和促进细胞存活的因子，在破骨细胞破坏细胞外基质后，这些成分可以被癌细胞利用。(C) 扫描电镜显微照片显示了骨转移患者的正在发生的溶骨性损伤是多么的可怕（见箭头指示处）。(A and B. from T. R. Arnett and D. W. Dempster，Endocrinol. 119：199-124，1986；C，courtesy of G. R. Mundy.）

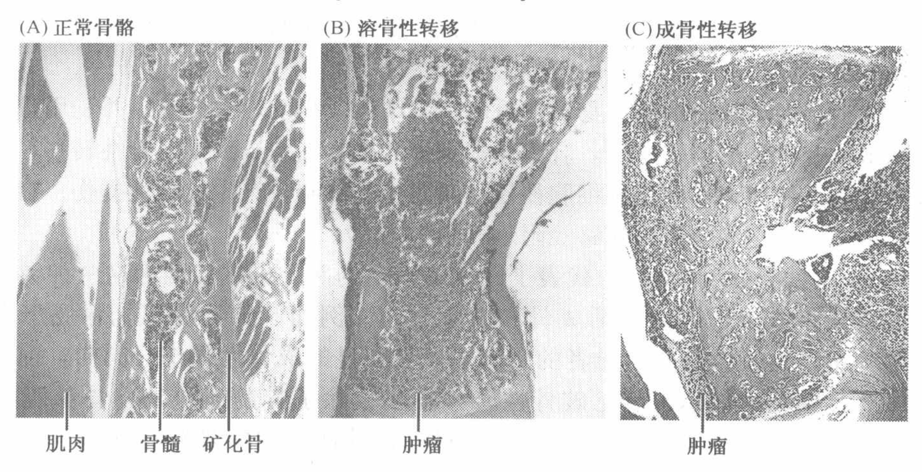


图 14.45 溶骨性和成骨性转移 显微图片显示的是椎骨和股骨的切片，可清晰地分辨矿化骨（橘色）、周围的肌肉（亮红色）和骨髓（深紫色）。(A) 对照小鼠的椎骨仅注射了缓冲液，可见其椎骨由广泛的骨髓和贯穿其中的矿化骨组成。(B) 在携带可造成溶骨性损伤的乳腺癌细胞系（MDA-MB-231）的小鼠模型中，大部分矿化骨已消失，骨髓已被大量的肿瘤细胞所代替（深红色）。(C) 在携带可造成的成骨性损伤的乳腺癌细胞系（ZR-75-1）的小鼠模型中，骨髓所在位置充斥着大量的矿化骨（橘色），而且在其左右侧可见明显肿物。(From J. J. Yin，K. S. Mohammad，S. M. Kakonen et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100：10954-10959，2003.）

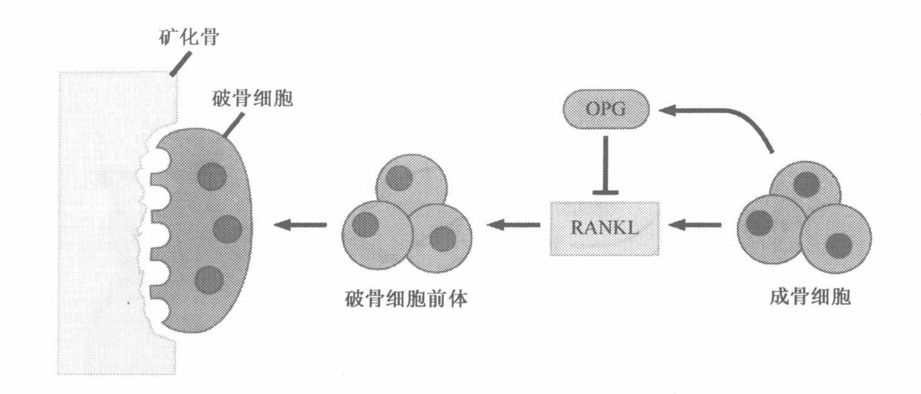


图 14.46 破骨细胞和成骨细胞 骨形成和再吸收的生理平衡是由成骨细胞和破骨细胞间的信息传递完成的。在此环路中，破骨细胞通过封闭骨的断面和分泌消化性酸性物质降解矿化骨；随后，成骨细胞填充至新骨的凹陷。成骨细胞释放的 RANKL 通过破骨细胞前体表面的 RANK 受体，诱导后者成熟为功能性的破骨细胞。成骨细胞还可以分泌 OPG，它可以结合 RANKL，抑制破骨细胞表面的 RANKL 分子的活化。因此，RANKL 和 OPG 的相互制约决定了骨生长/损失的净比例。

破骨细胞的成熟。因此，RANKL（激活作用）和 OPG（抑制作用）生物信号的平衡决定了破骨细胞的激活状态。

成骨细胞和破骨细胞之间的动态相互作用为发生骨转移的癌细胞发挥作用提供了背景。这两种细胞向骨骼的趋化最终源于构成磷酸盐沉积有机骨架的非矿化的胶原性细胞外基质（ECM）（图 14.44B）。

骨细胞外基质异常富含可促进几种癌细胞生长的促有丝分裂因子和营养因子。结果癌细胞通过激活骨的去矿物化进入到富含多种营养因子的细胞外基质库，这些因子可以支持其自身的繁殖和存活。

转移性癌细胞通过滋养骨骼的血管到达骨骼。一旦抵达骨骼，它们便黏附于骨髓面的基质细胞。特别是转移性乳腺癌细胞，一旦到达骨骼，它们就恢复了其正常前体（乳腺上皮细胞，MEC）的行为学特征。在哺乳过程中，MEC 分泌乳汁时会形成分泌甲状旁腺（激）素相关肽（PTHrP）的乳腺小囊（小泡）。PTHrP 通过血液循环到达骨，然后启动激活破骨细胞溶解骨的一连串事件，导致钙离子动员。游离的钙离子再通过血液循环进入乳腺，通过 MEC 进入乳汁。

转移到骨骼的乳腺癌细胞破坏了这种生理性的钙动员机制（图 14.47）。乳腺癌细胞黏附于骨表面的基质细胞后，便恢复正常的 MEC 功能，分泌 PTHrP。PTHrP 直接结合成骨细胞表面的受体，引发这些细胞释放 RANKL。随后 RANKL 诱导破骨细胞前体分化为活化型的破骨细胞。活化型的破骨细胞降解附近的矿化骨组织，由此释放黏附于骨细胞外基质的大量生长因子。

生长因子，包括 PDGE、骨形态发生蛋白（bone mor-phogenetic protein，BMP）、成纤维细胞生长因子（FGF）、胰岛素样生长因子 1（IGF-1）和 TGF-β，从骨的 ECM 中释放出来，成为乳腺癌细胞生长的养料，并且诱导癌细胞分泌更多的 PTHrP。

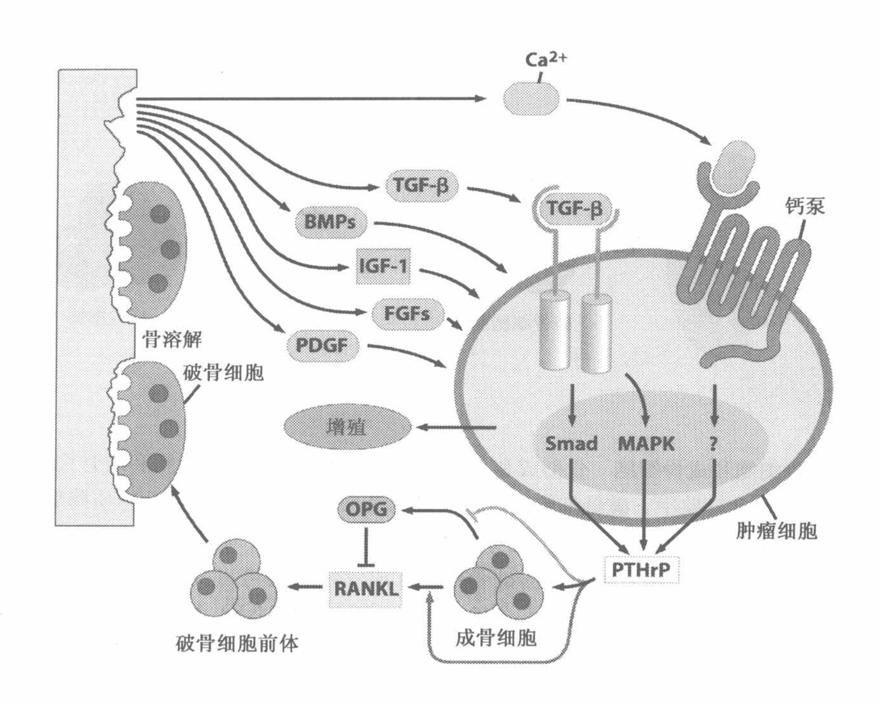


图 14.47 溶骨性转移的恶性循环 乳腺癌细胞（右图，灰色）释放的 PTHrP 改变了附近成骨细胞的信号传递：它们增强了 RANKL 和（红色箭头）降低了 OPG 的合成（蓝色箭头）。RANKL 诱导破骨细胞前体的成熟（图 14.44B），导致 TGF-β、Ca^{2+} 和 IGF-1 的释放（左上和中）。IGF-1 和 Ca^{2+} 促进癌细胞的增殖和存活，多余的 TGF-β 诱导癌细胞释放更多的 PTHrP，导致自我维持的正反馈环路的出现，被称为溶骨转移的“恶性循环”。（From G. R. Mundy，Nat. Rev Cancer 2：584-593，2002.）

PTHrP 引发破骨细胞更为严重的骨溶解，导致正反馈增强的信号传递系统出现，被称为“恶性循环”，在这一过程中 TGF-β 也发挥了重要的作用（信息栏 14.9）。

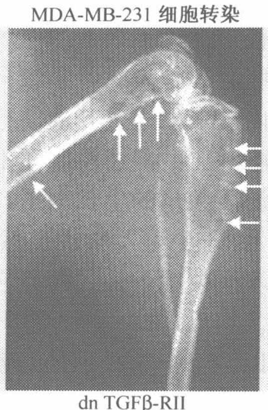
信息栏 14.9 TGF-β 和 PTHrP 在乳腺癌溶骨性转移的恶性循环中发挥关键作用

转移至骨的乳腺癌细胞比其他未转移的癌细胞产生更多的 PTHrP，这表明 ECM 释放的某些生长因子刺激转移癌细胞合成 PTHrP。一些简单的实验证明最重要的因子是 TGF-β。其中的一项研究显示，细胞表面缺失 TGF-β 受体的人乳腺癌细胞（它阻断细胞对 TGF-β 的应答）停止合成 PTHrP 并且丧失了有效导致溶骨性转移的能力（图 14.48）。在另外一个实验中，丧失骨转移能力同时又不分泌 TGF-β 的乳腺癌细胞通过表达载体强制诱导其分泌 TGF-β，后者以自分泌的方式激活这些细胞合成自身的 PTHrP，从而导致大量细胞发生骨转移。最后，在小鼠体内，针对 PTHrP 的抗体可以阻断人乳腺癌细胞导致的溶骨性损伤的能力。这些发现导致了图 14.47 中描绘的“恶性循环”模型的产生。

MDA-MB-231 细胞转染







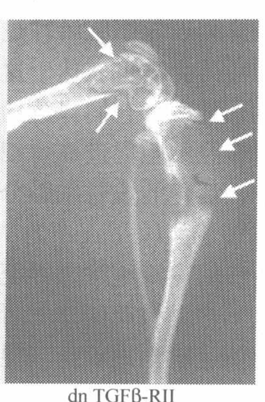


图 14.48 TGF-β 和溶骨性转移的形成 溶骨性转移的"恶性循环"模型存在的证据部分来源于 MDA-MB-231 细胞实验的结果。MDA-MB-231 细胞是一种人乳腺癌细胞系，它通常会导致溶骨性转移（图 14.45B）。用 X 射线监视携带 MDA-MB-231 细胞移植瘤的小鼠后腿观察其骨转移的情况。当显性缺失 II 型 TGF-β 受体（dn TGF-βRII）的重组质粒转染细胞后，这一突变阻断细胞对 TGF-β 的应答。没有 TGF-β 的刺激，这些癌细胞不会产生溶骨性损伤（左图）。但是，若通过额外引入特异组成性表达活化 I 型 TGF-β 受体（ca TGF-βRI）克服细胞对 TGF-β 的无应答，就可以恢复这些细胞产生溶骨性损失的能力（中图箭头）。这一发现本身不能明确说明 ca TGF-βRI 是如何恢复这些细胞产生溶骨能力的。明确的答案来自于引入 PTHrP 表达（而非 ca TGF-βRI）的另一实验，表达 PTHrP 的细胞恢复了形成溶骨性转移的能力（右图箭头）。这表明，TGF-β 通过促进乳腺癌细胞释放 PTHrP 激活溶骨活性，然后继续激活成骨细胞的过程（图 14.47）。（From J. J. Yin，K. Selander，J. M. Chirgwin et al.，J. Clin Invest. 103：197-206，1999.）

这一循环中的几个关键分子可能成为治疗的靶点。最有希望的是口服药物复合物，如 **bisphosphonate**，这些药物可被组成骨矿物组分的磷酸盐晶体所吸收，药物分子可以在局部停留长达 10 年之久。当含有 bisphosphonate 的骨被破骨细胞溶解时，后者会被释放的 bisphosphonate 所损伤，导致自身的凋亡。因此，bisphosphonate 可用来降低多种溶骨性损伤骨转移癌的损伤程度。

当携带人乳腺癌细胞的免疫缺陷小鼠接受 bisphosphonate 治疗时，溶骨性损伤的数量有所下降，同时这些动物的肿瘤负荷也下降了。这一发现的另一个启示是在肿瘤进展晚期，这些乳腺癌细胞的增殖尤其依赖于骨溶解以及溶解骨释放的生长因子。而且，bisphosphonate 治疗可以给转移性乳腺癌患者带来更多的益处（信息栏 14.10）。近来，同样可以阻断"恶性循环"并进入临床一期试验的 OPG 衍生物，可以大幅度降低骨髓瘤和转移性乳腺癌患者骨溶解的概率。

信息栏 14.10 溶骨性损伤产生破坏的其他方式 除了溶骨性损伤造成躯干骨的腐蚀性缺陷（包括重度骨骼疼痛和骨折）以外，骨溶解还会产生一种更加微妙的效应：大规模的骨溶解会导致高钙血症，即循环中钙含量增高。同时，骨转移导致的 PTHrP 释放入血会引起肾脏排钙功能下降，进一步提高血钙浓度。这种高钙血症通常预示着恶性疾病的最后一个阶段，会引发广泛的症状，包括胃肠道、尿道、心血管和神经精神问题。对这些患者予以 bisphosphonate（降低骨溶解）和 PTHrP 抗体（增强肾脏的泌钙能力）治疗可以大大降低血钙浓度。

可以预测，成骨性损伤依赖于其他激活成骨细胞而非破骨细胞的信号传递方式。在

这里，转移性癌细胞释放的生长因子——“内皮素-1”（endothelin-1，ET-1），在激活成骨细胞和抑制破骨细胞活性过程中发挥了显著的作用。前列腺原发瘤癌细胞释放内皮素，由于其同类受体也表达于这些癌细胞表面，导致自分泌激活环路的形成。然而，当癌细胞到达骨髓后，它们释放的内皮素也通过其他信号途径激活成骨细胞，造成成骨性损伤（前列腺癌细胞促进成骨细胞活化的确切机制还不清楚。可能的原因是，在矿化骨形成过程中，活化的成骨细胞分泌了大量的生长因子，一些生长因子促进成骨转移中癌细胞的生长）。所以，Paget 的“种子-土壤”学说虽然有道理，但是不够深入。如同种子一样，转移的癌细胞被撒播至不同位置，但是一旦它们降落至某一局部，在未来的命运中它们就不再是被动的参与者。相反，这些癌细胞开始辛勤地耕耘自己的土地，为其施肥，以便使这块土地肥沃到足以确保自己和子孙的繁衍。

14.11 转移抑制基因参与转移表型的调节

据文献报道，很多基因可促进侵袭-转移级联的发生。其中一些基因编码我们熟知的生长因子、生长因子受体或者信号传递蛋白。如果将这些基因转化不同的上皮细胞，可促进上皮-间叶细胞转换（EMT），增强细胞活动甚至侵袭的能力。实际上，这些基因的表达失调，很可能就是驱动侵袭和转移事件的原因所在。

值得强调的是，这些基因的蛋白产物可作为控制很多细胞生理事件复杂环路的一员而发挥作用。同所有精细调控的环路一样，它们既包含正性调节因子又包含负性调节因子，以确保精细调控信号的正确输出。由此我们可以得到这样的结论：细胞内一定存在很多可以抵抗和平衡促进晚期肿瘤侵袭和转移效应分子功能的负性调控分子。这些负性调控元件，类似于肿瘤抑制因子，被称为转移抑制基因。

可以设想，这些转移抑制因子在不同水平调节侵袭和转移，包括主要的多效性调节因子、信号传递蛋白和各种生化改变的效应蛋白（表 14.4）。这些因子已被多种实验策略鉴定。它们通常在原发肿瘤中高表达而在转移灶中低表达，提示它们在阻断肿瘤恶性进展晚期事件中发挥着重要的作用。

表 14.4 转移抑制候选基因

名称	细胞定位	作用机理
BRMS1	核蛋白	参与染色体重构
CRSP3	核蛋白	转录因子
KAI1/CD82	跨膜蛋白	细胞-细胞相互作用?
KISS1	分泌蛋白	G 蛋白偶联受体配体
NM23	细胞质激酶	MAPK 级联反应调节因子?
RhoGDI-2	胞浆蛋白	Rho 蛋白功能负性调节因子
SseCKs	细胞质	细胞骨架相关蛋白
VDUP1	细胞质	MAPK 级联反应调节因子?
CDH1（=*E*-钙黏素）	细胞表面黏附蛋白	帮助上皮细胞形成片层结构
TIMPS	分泌蛋白	基质金属蛋白酶抑制因子
MKK4	细胞质	MAPK 级联反应中的蛋白激酶组分

Adapted in part from P. S. Steeg, Nat. Rev. Cancer 3：55-63，2003.

这些观察仅是一些相关性的结果，还没有其他实验能证实它们在抑制转移中的因果

关系。例如，验证候选基因是否为真正的转移抑制基因只需一个简单的标准：如果人为的使目的基因在原发肿瘤细胞中过表达，这一基因是否维持肿块继续生长，同时又抑制肿瘤的远处转移？一些基因符合以上的条件，而其他的基因作用并不特异，它们可以抑制所有类型细胞的繁殖，包括那些不具有侵袭和转移能力的细胞。然而，其他的候选肿瘤抑制基因仅能够抑制少数类型恶性肿瘤细胞的转移。

第一个被发现的转移抑制基因是1988年在小鼠黑色素瘤中发现的 *NM23* 基因。随后的研究显示它可以在体外抑制细胞的活动和侵袭能力，还发现它可以抑制实验肿瘤的转移能力。NM23的生物化学机理可能与它和KSR蛋白形成的生理性复合体有关，它们作为汇集ERK-MAPK信号传递相关蛋白的支撑骨架，促进信号快速有效的传递（6.5节）。因此，NM23可以通过调节关键信号通路的活性影响细胞的转移能力。也有报道称NM23具有核苷二磷酸激酶（将核苷二磷酸转化为核苷三磷酸）、组氨酸激酶或者丝氨酸激酶的活性。果蝇NM23类似物awd的相关研究显示它在抑制细胞迁移过程中发挥作用。但是它作为转移抑制候选蛋白的地位变得更加复杂：有报道称awd在晚期卵巢癌、胃癌、结肠癌和肉瘤中高表达。

在本章中已多次提到的E-钙黏素分子，也被认为是转移抑制基因的产物。它的稳定上皮细胞间连接和抑制EMT的功能使它跻身于阻断细胞侵袭表型分子的行列。正如我们所知，侵袭性癌通过多种机制下调其表达。同样，我们可以很容易地想象到结合并使细胞间隙MMP失活的金属蛋白酶组织抑制因子（TIMP）是如何抑制癌细胞侵袭和转移的。

另外一个肿瘤抑制基因编码KAI1/CD82蛋白，它是4次跨膜蛋白质。在许多晚期肿瘤（肺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌和胃癌）中，该基因的表达大幅度下调。在乳腺癌患者癌细胞中，KAI1的低表达与不良预后相关。对于培养的细胞，KAI1在抑制迁移和侵袭的同时还增强细胞的聚集。它定位于黏着连接附近，在细胞间连接中发挥作用。也有报道发现KAI1可以作为EGF受体信号传递的拮抗剂。

另外一个感兴趣的基因编码KISS1蛋白，研究发现它是细胞表面G蛋白偶联受体（GPCR，见5.7节）的一个配体。*KISS1* 基因在肿瘤细胞内的异位表达抑制了其转移活性，但不影响原发瘤的生长。同本类型的其他几个基因一样，它确切的转移抑制机理还不清楚。

还有很多候选转移抑制因子。Rho鸟嘌呤核苷解离抑制因子-2（RhoGDI-2）是Rho蛋白的负性调节因子。Rho蛋白通过封阻这些胞浆内的GDP结合蛋白，抑制它们重构肌动蛋白细胞骨架（14.7节）。一项包含105名膀胱癌患者的大样本临床研究显示，这一编码基因的表达与侵袭潜能呈负相关。鉴于Rho样蛋白在细胞运动和侵袭中发挥的关键作用，RhoGDI-2已成为科学家们关注的癌细胞侵袭和转移抑制因子。

乳腺癌转移抑制因子-1（BRMS-I）在转移性乳腺癌中低表达。它在乳腺癌和黑色素瘤中的异位表达可抑制转移，但不影响肿瘤的发生。研究发现，它可以增强缝隙连接细胞间的信息交流。缝隙连接包含的通道可以使邻近细胞间交换分子质量小于10^3的分子。而且，还发现BRMS-1蛋白在细胞核内作为蛋白复合体的一部分参与染色质重构。显然，如何将这些迥然不同的功能联系起来还需进一步的研究。

对转移抑制因子的研究才刚刚起步，明确的分子机理还有待进一步探讨。归入这一

类的一些基因，包括 E-钙黏素、*RhoGDI-2* 和 *TIMP* 等，编码的蛋白质是侵袭和转移过程的重要参与者。其他许多转移抑制蛋白和细胞恶性表型的生化联系还不是很清楚。直到发现这些基因在肿瘤细胞基因组内通过突变或启动子甲基化而失活，才能确定它们在调节癌细胞恶性表型过程中发挥的确切作用。

14.12 隐性微转移缩短癌症患者的长期生存时间

纵观整个章节，我们可以反复地读到转移的发生是多么的低效。癌细胞在经历侵袭-转移起始阶段时经历的重重困难导致了其转移的低效性。很多癌细胞在远处转移位点存活下来，但是不能形成肉眼可辨别的转移灶。结果在很多癌症患者体内存在遍布全身的无数的微转移灶。

虽然微转移几乎不能形成临床上可检测到的转移灶，但是它确实可以提示原发瘤已将癌细胞播散至全身。如果其中的一些微转移在其种植于远处组织几年后发展成临床可辨的转移，那么将降低癌症患者的长期生存时间。乳腺癌的可怕之处就在于肿瘤被切除并且宣布患者身上无肿瘤 10 年甚至 20 年之后肿瘤的再次复发。

对乳腺癌的一项研究显示，微转移可在骨盆髂前上棘采集到的骨髓中检测到。大约有 1%非恶性肿瘤患者的骨髓内可见细胞角蛋白阳性的细胞（即上皮细胞）。相反，36%的 I、II、III 期乳腺癌患者骨髓中可见微转移。骨髓中微转移的出现已被证明是一个非常有意义的判别肿瘤复发的指标（图 14.49A）。这样，在 4 年内，有骨髓微转移的患者中 25%会死于癌症，而无骨髓微转移的患者中只有 6%死于癌症。总体来看，伴有骨髓微转移的患者复发或死亡的概率比无骨髓微转移的患者高 4 倍。另一项研究显示骨髓中发现单个或癌细胞簇的患者的死亡率比无骨髓微转移的患者高 10 倍。

接受手术治疗（切除原发瘤）的结肠癌患者通常会在术后一年或两年复诊时发现少量的肝内转移，但是其他脏器没有转移灶；手术可以切除这些转移瘤，而且临床结局很好，骨盆骨髓的微转移情况可以评分。没有微转移的患者中大约有 90%可以生存 15 个月以上，而有微转移患者中仅有 30%可存活 15 个月以上（图 14.49B）。

治疗食管癌的方法为我们理解转移扩散提供了另一条思路。食管癌患者通常接受手术治疗，手术要求去除一个或多个肋骨片段，从肋骨断端可以很容易地取到骨髓。两项独立的研究报道术中发现患者肋骨骨髓微转移概率分别是 79%和 88%。乳腺癌新发病例中有 30%可检测到微转移，而食管癌的高微转移概率与此类患者的不良预后紧密相关。

黑色素瘤的相关文献也提示隐匿性或休眠性（即隐藏但没有显著生长的迹象）微转移带来的长期危害。一份记载详细的病例报道中，一位黑色素瘤患者接受了切除手术，16 年后从他尸体中取出的肾脏组织被用作器官移植的供体。紧密随访这一患者长达 15 年都未发现肿瘤的复发。然而，肾移植后不久，接受他肾脏的两个受体都患有与供体一样的侵袭性黑色素瘤。

阻止微转移发展为危害人体健康的生长型肿瘤的机制还不清楚。在一些实例中，可以发现微转移环绕小血管生长；这提示它们缺少自身血管生成的能力，但是可以利用附近宿主的毛细血管。在骨髓中发现的大多数微转移中，受累细胞缺少任何细胞增殖的标

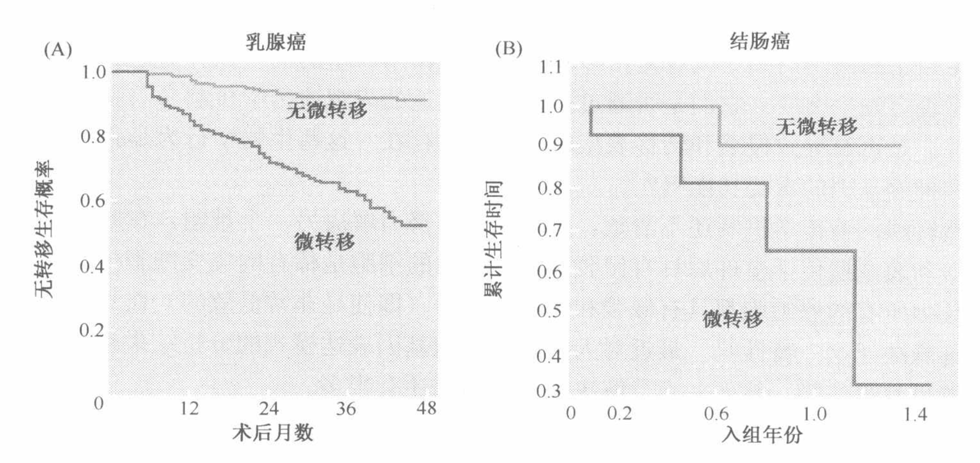


图 14.49　微转移和临床预后　（A）Kaplan- Meier 曲线显示了手术切除原发瘤后不同时间点存活并且无远处转移的乳腺癌患者所占的比例。在手术时已发现有微转移的患者（红线）复发概率显著高于无微转移的患者（蓝线）。（B）对 54 位肝转移的结肠癌患者的研究结果与以上的结果也非常相似，这些患者在术前诊断中都未发现明显的肝外转移灶。他们都接受了肝转移肿瘤切除术。那些骨髓中没有细胞角蛋白阳性转移细胞的患者（绿线）临床进程明显好于骨髓中有细胞角蛋白阳性转移细胞的患者（红线）。在本例中，纵坐标表示患者存活的比例，横坐标表示他们接受治疗后入组临床研究的年限。（A，from S. Braun，K. Pantel，P. Muller et al.，N. Engl. J. Med. 342：525-533，2000；B，courtesy of R. A. Tollenaar.）

记物，因此可以长时间（几个月乃至几年）处于非生长期，癌细胞处于 G_0 期（信息栏 14.11）。因为这些细胞是非生长性的，它们可能对针对术后残余病灶中持续生长细胞的化疗药物不敏感。

信息栏 14.11　是不是所有的微转移真的都处于休眠状态？　转移性疾病的休眠通常是一种错觉。由此，我们可以设想在切除原发瘤后携带“微小残存疾病”患者的体内，微转移克隆有时会获得继续生长的能力，由此导致转移播散和疾病复发（图 14.11）。重要的是，这种细胞表型的主要改变（或者是基因型的改变）在不生长或休眠的细胞群中发生概率很低。事实上，持续多年的研究结果发现，这些改变仅在增殖细胞群中自发性发生。因此，在很多“微小残存疾病”患者的体内，一些微转移癌细胞的克隆必须通过反复的生长与分裂周期，并且通过一些随机事件，偶尔衍生出获得克隆形成能力的突变细胞。这些微转移可无临床症状的潜伏数年，原因在于细胞凋亡速率与增殖速率基本平衡。

免疫学的机制也可以抑制微转移的生长并防止转移疾病的复发。这一推论源于免疫抑制的器官移植受体中偶尔可见侵袭性转移肿瘤快速生长的现象。此外，肿瘤干细胞的发现可能有助于解释为什么大多数种植性微转移不会发展为可辨的转移灶（补充材料 34 ◎）。另外，抑制微转移在组织寄居处成功克隆化的机理也需要进一步探讨。

14.13　总结与展望

同其他生物学表型一样，癌细胞侵袭和转移的生物学行为都是由基因功能引发的。

有几个主要问题使发现癌侵袭性表型的遗传学决定因素复杂化：这些表型是由少数几个多效、主控基因决定的吗？或者是由多基因的相互作用产生的吗？在肿瘤进展过程中这些基因是否会发生突变？它们是否通过控制基因表达的表观遗传学机制参与肿瘤进展的晚期事件。是否有导致侵袭和转移表型的主控基因存在？这些生物学行为是我们熟知的癌基因和抑癌基因的次要功能吗？

虽然转移的遗传学机制还不清楚，科学家们正努力解决另一个难题：在原发瘤中经历遗传学和表观遗传学事件后具有侵袭和转移能力的细胞是稀有的突变细胞吗？某些肿瘤原发灶中所有的癌细胞都具有侵袭和转移的能力（即使是非常低效的）而其他肿瘤的大多数细胞缺乏这一特性吗？最近对人类不同肿瘤基因表达模式的分析结果提示第二种机理可能更站得住脚。然而，亟待解决的未知问题还有很多。

其中的一项研究表明，转移倾向与人类乳腺癌中一些特异的基因表达模式相关。而且，原发瘤中大多数细胞都表现出这一特征性的基因表达谱（图 14.50）。这提示在肿瘤多阶段进展过程中，原发瘤内不断积累了转移潜能；这种转移潜能并非来源于肿瘤形成之后的原发瘤中一小群特化的癌细胞。如果仅仅是原发瘤中一小部分的癌细胞具有转移能力，那么它们的基因表达模式不会影响整个肿瘤细胞群体的基因表达模式，而且肿瘤整体也不会表现出转移性的特征表达模式。

另外一项研究显示，原发肿瘤大部分细胞的基因表达模式与转移灶细胞非常类似；对 15 对原发瘤和相应转移灶的分析结果证实了这一点（图 14.51）。如果可以进一步证实，那将意味着原发肿瘤的癌细胞并不需要改变基因表达而实现转移并在远处器官克隆化的目的。

临床上有 5%的肿瘤病例找不到原发灶，这类肿瘤称为原发灶不明癌（cancer of unknown primary，CUP）。这种现象进一步支持了原发瘤大多数细胞具有转移能力的观点。在这些病例中，转移性生长是这些肿瘤患者首先表现出的临床体征。这些患者中有 30%是无法检测到原发灶的，另外 70%仅在尸检时才可发现原发灶的具体位置。

对于大多数的 CUP 患者来说，似乎在原发瘤很小的时候就可以种植转移癌细胞。考虑转移的低效率（成功率可能仅为 10^{-8}～10^{-6}）和原发瘤细胞群的微小，原发灶内大多数细胞具有种植转移后代的能力似乎是可以理解的。并且，正如前面提到的，在原发瘤中产生致瘤性细胞的遗传学进化过程可能同时创造了能将它们的后代播散至机体不同位置的细胞群。

虽然没有一项研究结果可以提供无懈可击的证据，但是它们都支持同一观点：转移细胞来源于原发瘤中大多数的细胞，而非少数、特异、非遗传代表性的亚细胞克隆群。如果这一设想最终被证实，那将解释为什么相对少数肉眼可辨转移的形成不是因为原发瘤中只存在少数具有高度竞争能力和高质量适于转移的细胞。事实上，某些原发瘤的大部分细胞可能具有转移能力，很多细胞可以迁移至机体的远处。然而，最终形成的转移灶数目可能严重受限于转移的低效性。关于转移竞争力遗传学进化的一些推测进一步强化了这一观点（补充材料 35 ◎）。

但是，相反的实验结果源于原发瘤能转移至肺的小鼠实验。本章曾提及，多次实验证实从肺转移灶中分离的转移性癌细胞比原发瘤的大多数细胞有更强的肺转移能力。观察结果强烈提示这些转移细胞至少在某种程度上不同于原发瘤的大多数细胞，它们的基

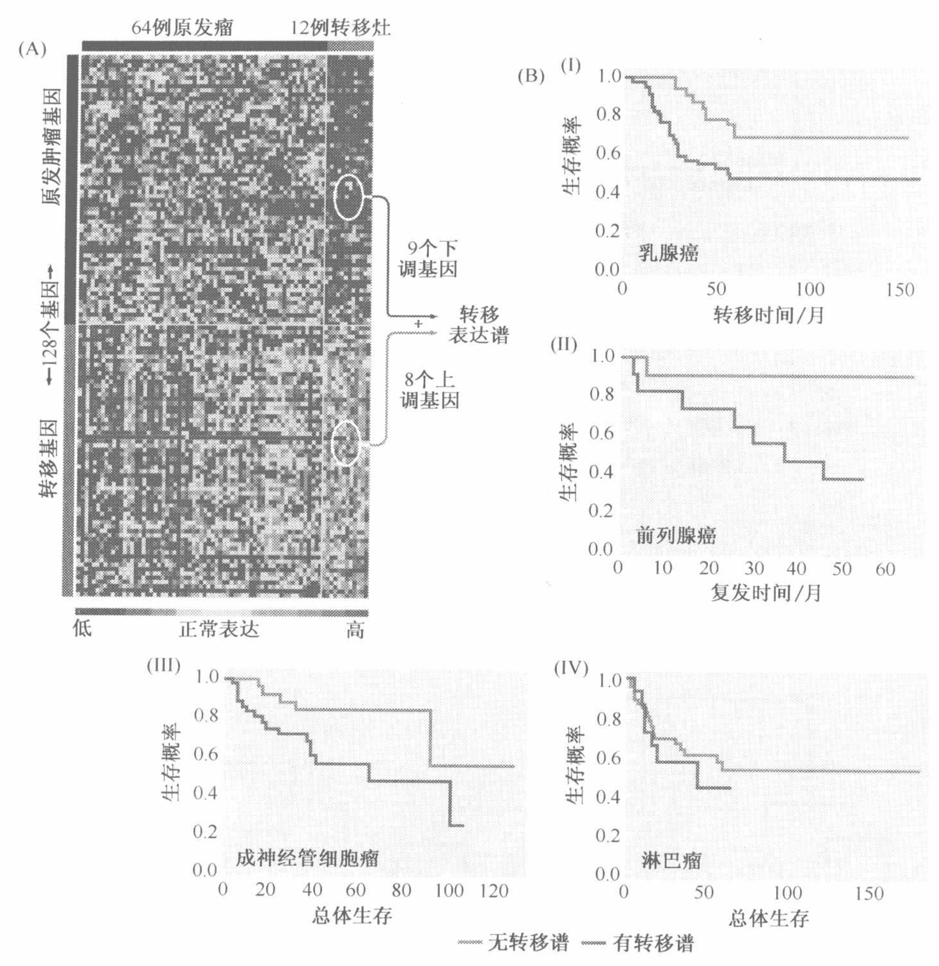


图 14.50 应用表达芯片预测疾病进展 用芯片分析基因表达使得同时监控决定一个或一组特异表型的成千上万基因的表达模式成为可能。(A) 在此例基因表达芯片分析中，高表达基因用红色标记，低表达基因用蓝色标记。对来源于 64 个原发腺癌（源自于不同组织）和 12 个腺癌转移结节的 RNA 分析后发现（图顶端分别用黑、红条表示），在表达芯片初始分析的成千上万个基因（未显示）中，128 个基因的表达与转移相关（它们表达升高或降低）（垂直的红、黑条）。进一步挖掘数据发现用 17 个基因就可以区分转移癌和原发癌，区分能力与 128 个基因组合相当。重要的是，这种转移特异的表达模式在初始分析的一组原发性肿瘤中就存在，提示它可用于预测其他组人类肿瘤的转移潜能。(B) 研究人员利用转移特异的表达模式 A 分析其他组原发肿瘤基因表达模式时，他们可将乳腺癌 (I)、前列腺癌 (II) 和成神经管细胞瘤 (III) 分成两组（蓝线和红线），在手术后这两组患者有着截然不同的临床进展和肿瘤复发时间。但是，利用转移特异的表达模式无法预测淋巴瘤 (IV) 的临床进展，提示一些共同的基因调节着实体瘤的转移，未知基因调节着血液来源肿瘤的恶性进展和转移。(From S. Ramaswamy, K. N. Ross, E. S. Lander and T. R. Golub, Nat. Genet. 33: 49-54, 2002.)

因型或基因表达谱使它们更具转移性。这也提示转移细胞可能真是原发瘤中少数细胞的代表，它们很可能形成于肿瘤进展的晚期。

无论是哪一种转移模型最终得到证实，特异参与转移形成的基因都还没有确定。此外，很难确切的了解一些基因在侵袭和转移的多步骤事件中是如何被活化的。在不同水

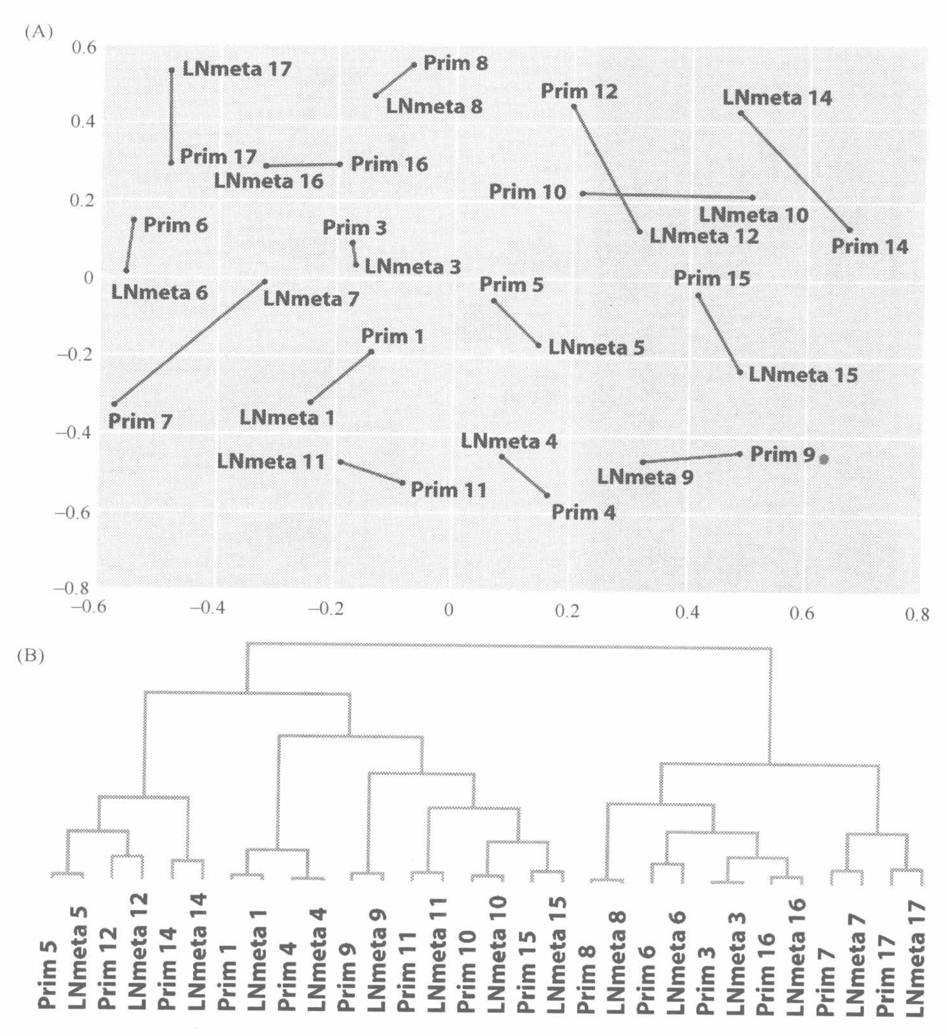


图 14.51 原发肿瘤和转移瘤的遗传相似性 应用基因表达芯片，根据原发瘤和转移灶的基因表达谱将不同的原发瘤和转移灶分为几类（见 14.51 节）。然后，应用统计学的方法计算成对活检组织（原发瘤和转移灶）的相似程度。(A) 如图所示，来源于一组患者（每一个患者都有自己的编号）的原发肿瘤和相应淋巴结的活检组织置于一张二维图上，在图中两个点之间的距离反映了基因表达模式的相似度。可见大部分原发瘤（Prim）与相应的淋巴结转移灶（LNmeta）距离接近，提示基因表达模式相似。(B) 另外，可以应用基因表达模式绘制原发瘤和转移灶相关性图谱，用树形图反映相关程度。所谓树形图，就是将关系最密切的肿瘤样本置于同一或邻近的分枝上。转移灶的基因表达模式几乎总是与原发瘤一致。(Courtesy of B. Weigelt and L. J. van't Veer.)

平用实验的方法解决以上问题都受限于其复杂性。

1. 面临的首要困难源于侵袭-转移过程的复杂性。既然这一过程涉及不同的步骤，是不是有多个基因参与了此过程？转移的癌细胞是否激活并利用了潜在的发育程序（14.3 节），如 EMT 可以同时影响多步骤的改变，包括突破基底膜、侵入机制、血管内渗及血管外渗（信息栏 14.12）？

信息栏 14.12 需要重新考虑侵袭-转移的步骤吗？ 侵袭-转移经常描绘成连续的 6 个步骤（局部浸润、血管内渗、转运、血管外渗、形成微转移和局部克隆性生长；图 14.4）。这一模式提示癌细胞必须通过基因组大量的遗传学或表观遗传学的改变获得执行每一步骤转变的能力。然而，EMT 诱导的转录因子（TF）的多效性和微转移遗传学进化方面积累的证据可能会在不久重新描绘侵袭-转移的多步骤事件。在很多肿瘤中，三步程序的描述可能更恰当。第一步涉及一个或几个这类 TF 的表达以及随之而来的侵袭能力的活化、血管内渗、转移至远处、血管外渗并形成微转移。这样，很多原发瘤（如 30%人类乳腺癌）哪怕是非常小的肿瘤都可以种植微转移，因为这些肿瘤的大部分细胞可以表达一个或多个 EMT 诱导的 TF。第二步涉及克隆化能力的获得。可能仅有少数的微转移在它们种植机体不同组织数年后才能获得此能力。第三步就是微转移发展为可见的转移灶，并导致疾病的复发和广泛的远处转移。

2. 转移的低效率使实验分析复杂化。即使在癌细胞获得促进转移的基因型和表型时，转移的效率也是异常的低下。基因型和表型之间的微弱联系限制了目前现有实验研究策略的应用。

3. 还有另一个因素使得遗传学和表观遗传学因子在转移特性中共同发挥作用的研究复杂化。例如，在某种癌动物模型中，当转化 ras 的细胞受 TGF-β 刺激后就可发生 EMT（14.4 节）。这种侵袭性转变由某一特异信号引发，该信号可以改变一些组织微环境内细胞的遗传表型。因此，在这些实例中，侵袭和后续的转移就不能描述为遗传性的特征，而且正因为这个原因，常规的实验技术无法研究这类问题。

4. 在很多肿瘤中，直接参与程序性侵袭和转移事件的基因和蛋白质仅在原发瘤的侵袭边缘表达，而且这些处于侵袭边缘的癌细胞可能只代表肿瘤细胞群体的小部分细胞。这使得设计用于揭示侵袭和转移能力的实验更加复杂化，这些实验通常要依靠对来源于手术切除的肿瘤内大部分癌细胞的分析。

5. 癌是人类肿瘤最常见的类型，在肿瘤内的恶变上皮细胞需要经过 EMT 的过程获得侵袭和转移的能力。但是，如果侵袭的癌细胞完全经历了 EMT 过程，丢失了上皮细胞的所有特征，它们就变成了“披着羊皮的狼”，因为大多数的组织学分析方法无法将这些细胞与肿瘤相关基质中的非肿瘤间叶来源细胞区分开来（实际上，面临的这一困难解释了为什么很多肿瘤病理学家否认 EMT 是癌侵袭关键过程的原因）。

6. 转移的休眠是肿瘤实验研究的另一个难题。例如，对于乳腺癌，在原发瘤切除 20 年后可以突然发现转移灶。因为其潜伏期长以及患者携带相当数目的微转移，我们很难了解为什么只有小部分肿瘤患者会突然发生可威胁生命的转移瘤。

这些实验研究面临的困难严重地延缓了侵袭转移相关研究的进展，使得很多简单、基础的问题无法得到解答。例如，是否真的存在特异赋予癌细胞侵袭或转移表型的基因（补充材料 35 ◎）？另外，是否特异的转移抑制基因一定要在肿瘤细胞获得侵袭转移能力之前失活（14.11 节）？影响转移能力的基因或蛋白是否作为环形调节通路的一个组成部分，在本书中反复提到的癌基因和抑癌基因产物发挥的作用？

癌细胞的器官选择性，即癌细胞倾向于转移至一些器官而非其他器官，反映了另一类未解决的问题。研究人员从骨转移详细机理的大量研究数据中获得了一些认识（见 14.10 节）。然而，这类转移仅代表了一个罕见的特例，因为总体来说我们还不知道播散癌细胞与它们将要定居繁衍的其他组织重要功能性相互作用的信息。这种局面已经开

始发生转变（信息栏 14.13）。

信息栏 14.13　肿瘤细胞内一些基因的表达促进特异类型的转移　发现参与转移至特异器官的基因和蛋白的一个策略就是分离倾向定居于某一靶器官的肿瘤细胞。从器官中找到这些肿瘤细胞后，在体外传代培养，重新接种宿主小鼠；重新分离这一器官的转移细胞。这样就有可能筛选到稳定器官转移趋向性的癌细胞克隆。

此外，可以从人类癌细胞系中具有异质性的细胞群中分离单细胞克隆（即每个克隆细胞群都来自于一个分离的细胞）。然后分析每个克隆群的基因表达谱，分别确定它们转移至靶器官的趋向性。这种方法可鉴定癌细胞中与器官转移趋向性相关甚至是直接导致此事件的基因（图 14.52）。实际上，这一组基因在转移潜能低下的另一组细胞克隆群中的异位表达可以诱导这些细胞发生骨转移。这些实验还提示在异质性的肿瘤细胞群中，不同的已经存在的基因表达模式可以影响单个细胞，使其表现出不同的转移行为。

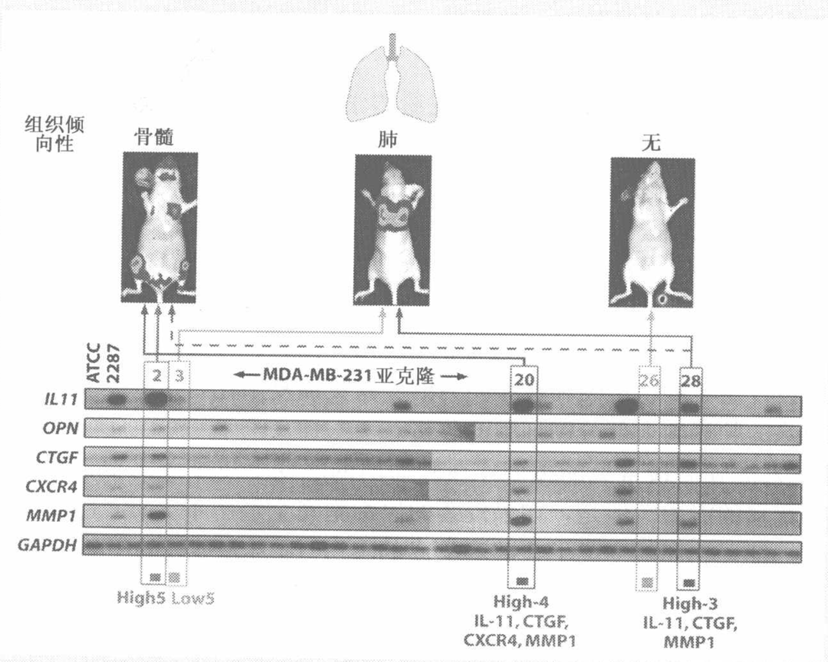


图 14.52　基因表达模式和转移趋向性　从大量人的 MDA-MB-231 细胞中挑选出 23 个单细胞（图 14.48），每个细胞在培养皿中都扩增为一个亚克隆群。针对 5 个基因：白细胞介素-11（IL 11）、骨桥蛋白（OPN）、结缔组织生长因子（CTGF）、趋化因子受体 4（CXCR4）、基质金属蛋白酶-1（MMP1），分析了每个亚克隆群的 mRNA 表达模式，以甘油醛 3 磷酸脱氢酶（GAPDH）mRNA 为对照。此外，也分析了原发肿瘤细胞群（ATCC，左框）的表达模式以及 2287 癌细胞亚克隆群（该细胞群具有骨转移的能力，左边第 2 个框）。所选的 5 个基因均在骨转移细胞中高表达，具有促进溶骨性转移功能。如图所示，将 2 号亚克隆细胞（红框）注射至小鼠动脉循环后，它表现出骨转移的能力，参见小鼠体内肿瘤成像的结果；这些细胞中以上 5 个基因的表达水平都很高。相反，3 号克隆细胞（黄框）中 5 个基因的表达水平较低，它表现出肺转移的能力。不表达 5 个基因的 26 号克隆细胞（黄框）根本不具有转移能力。而且，如果人为的使具有低转移潜能细胞同时表达以上 5 个基因中的 3 个基因，它们便获得高效骨转移的能力（未显示），说明这些基因直接参与了癌细胞的转移。通过细胞中萤光素酶基因的表达（可以使细胞释放生物发光信号），来使转移瘤成像。（From Y. Kang，P. M. Siegel，W. Shu et al.，Cancer Cell 3：537-549，2003.）

微转移的存在是那些希望在切除原发瘤后数年内预防肿瘤复发的临床医生面临的主要挑战。直径不到 0.2mm 的微转移可以包含几百到几千个细胞，机体内检测到大约 5×10^{13} 细胞是令人畏惧的。如果不清除这些微转移，它们会持续的威胁人类健康，因为一些微转移会在无法预测的某个时间突然暴发，并给机体造成致命的打击。

这一问题又直接引发另一问题：用于治疗原发瘤的方法是否也可用于治疗转移瘤？或是转移细胞与原发瘤的前体细胞差别很大，是否需要专门针对转移细胞的治疗方法？实际上，表达芯片结果提示原发瘤和转移灶之间存在很大的相似性（图 14.51），这给了我们一些希望。这些相似性使得有效去除原发瘤的治疗方案同样适用于去除转移细胞。

深入了解转移机制当然是未来肿瘤治疗发展所必需的。然而，目前面临以上列举的未解决的问题使我们停滞不前，因为这些问题显示出我们对癌症转移详细信息了解是多么的欠缺，同时也说明为什么在大多数肿瘤研究者眼中，侵袭和转移是肿瘤基础研究面临的主要挑战。

最后，让我们回到本章的伊始：如果像不断增加的实验证据显示的那样，EMT 是获得侵袭能力的关键事件，如果癌细胞重新激活了胚胎源性的转录因子以获得这些特征，那么在本章开始时提到的 Lewis Wolpert 关于原肠胚时期重要性的陈述也许需要修改为原肠胚形成和相关的 EMT 可能会成为严重危害我们生命的潜在危险之一！

重要概念

- 90％的癌症引起的死亡与侵袭和转移有关，而且在死亡时在转移灶而非原发瘤中可见大量的癌细胞。
- 侵袭-转移级联包括以下步骤：局部侵袭、血管内渗、转运、血管外渗、微转移形成和克隆化。
- 转移级联的连续步骤往往不能都完成，导致了转移的低效率。其中效率最低的步骤可能是克隆形成。
- 很多步骤都可以由激活上皮细胞间叶转变（EMT）生物学程序的癌细胞完成，EMT 经常见于胚胎早期发育和创伤修复。
- 在早期胚胎发育过程中参与正常生理事件的多效转录因子可以启动 EMT。
- 同癌细胞基因组遗传学和表观遗传学一起，癌细胞间质微环境释放的信号经常诱导癌细胞内 EMT 诱导性转录因子的表达，导致 EMT 发生。
- EMT 涉及上皮细胞基因表达程序的丧失和间叶细胞基因表达模式的获得。后者使细胞获得侵袭和运动的能力。
- 细胞运动受一系列 Rho 家族小 G 蛋白的调节，这些蛋白由胞浆内的信号转导通路活化并调节肌动蛋白细胞骨架的组装。
- 细胞侵袭在很大程度上受降解细胞基质组分基质金属蛋白酶（MMP）的调节。这些酶通常由肿瘤相关基质细胞合成。
- 转移癌细胞可以通过淋巴道转移至淋巴结。但是，大多数远处转移源于癌细胞的血道转移。

- 许多癌细胞进入血液循环在不同组织的小动脉和毛细血管内形成微瘤栓。
- 癌细胞外渗出血管的能力可能依赖于类似于其在早期侵袭和血管内渗中的行为。
- 虽然在人类不同肿瘤中侵袭-转移级联中的大多数步骤可能相似，但是最后一个步骤——克隆化可能依赖于不同种类转移细胞和它们着床的宿主组织微环境之间复杂的相互作用。
- 人们只对骨转移克隆形成的具体细节了解得比较透彻，特别是乳腺癌细胞的溶骨性转移。
- 在一些特例中，原发瘤部位和转移靶点部位之间的循环特点可以解释癌细胞转移的器官选择性。然而，在其他很多实例中，癌细胞从原发部位转移至特定靶器官的原因还不清楚。
- 侵袭和转移能力的获得看起来并不涉及原发瘤癌细胞基因型的主要改变。

思考问题

1. 哪些论断反对侵袭和转移可能是癌细胞在肿瘤进展晚期获得的特定突变等位基因共同作用下的结果？
2. 如何解释微转移内细胞克隆形成的低效性？
3. 哪些论断提示转移能力表现于原发瘤的大多数癌细胞或是少数专门负责转移的细胞？
4. 哪些事实暗示癌细胞遗传学和表型的进化可发生于体内远离原发瘤的部位？
5. 哪些特异类型的组织微环境可以确保癌细胞转移的成功？它们是如何确保癌细胞定位繁衍最终取得成功的？
6. 原发瘤形成后是如何展示其转移能力的？
7. 抑制转移的能力可以影响一些肿瘤的临床结局而对其他肿瘤无效吗？
8. 哪些证据支持 EMT 参与了人类肿瘤的病理发生，哪些证据不支持？
9. 准确评估已确诊的前列腺或乳腺肿瘤的预后会引起临床肿瘤工作中哪些重要的变化？

参考读物

Akhurst RJ & Balmain A (1999) Genetic events and the role of TGF-β in epithelial tumor progression. *J. Pathol.* 187, 82–90.

Barrallo-Gimeno A & Nieto MA (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132,3151–3161.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E & Vande Woude GF (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915–925.

Blasi F & Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 932–943.

Brabletz B, Jung A, Spaderna S et al., (2005) Migrating cancer stem cells–an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5,744–749.

Braun S, Pantel K, Muller P et al. (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with Stage I, II or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 525–533.

Brinkerhoff CD & Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 207–214.

Bray D (2002) Cell Movements. New York: Garland Science.

Burridge K & Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167–179.

Cavallaro U & Christofori G (2001) Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim. Biophys. Acta/Revs. Cancer* 1552, 39–45.

Cavallaro U & Christofori G (2004) Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.

Chambers AF, Groom AC & MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.

Comoglio PM & Trusolino L (2002) Invasive growth: from development to metastasis. *J. Clin. Invest.* 109, 857–862.

Condeelis JS (2001) Lamellipodia in invasion. *Semin. Cancer Biol.* 11, 119–128.

Conway EM & Carmeliet P (2003) Cardiovascular biology: signalling silenced. *Nature* 425, 139–141.

Coussens LM, Fingleton B & Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387–2393.

Coussens L & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420,

860–867.

deCaestecker MP, Piek E & Roberts AB (2000) Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1388–1402.

Derynck R, Akhurst RJ & Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117–129.

Egeblad M & Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinase in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.

Feldner J & Brandt BH (2002) Cancer cell motility—on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. *Exp. Cell Res.* 272, 93–108.

Fidler IJ (2001) in Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita, jr., S. Hellman, SA Rosenberg eds), pp 135–152. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Fidler IJ (2001) Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Cancer Metastasis: Biol. Clin. Aspects* 10, 257–269.

Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.

Hay ED (2005) The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dynamics* 3, 706–720.

Jaffe AB & Hall A (2002) Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv. Cancer Res.* 84, 57–80.

Jechlinger M, Grünert S & Beug H (2003) Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 415–432.

Karkkainen MJ, Mäkinen T & Alitalo K (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* 4, E2–E5.

Karpanen T & Alitalo K (2001) Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J. Exp. Med.* 194, F37–F42.

Klein CA (2003) The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell—the unit of selection. *Adv. Cancer Res.* 89, 35–67.

Linder S & Aepfelbacher M (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13, 376–385.

MacDonald IC, Groom AC & Chambers AF (2002) Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 24, 885–893.

Mareel M & Leroy A (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* 83, 337–376.

Mundy GR (2002) Metastasis to bone: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 2, 584–593.

Murphy PM (2001) Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N. Engl. J. Med.* 345, 833–835.

Nieto MA (2002) The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 155–166.

Overall CM & Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657–672.

Paget S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast (republication of 1889 *Lancet* article). *Cancer Metast. Rev.* 8, 98–101.

Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 71–78.

Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.

Ridley A (2000) Cancer: molecular switches in metastasis. *Nature* 406, 466–467.

Ridley AJ (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11, 471–477.

Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713–2722.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709.

Riethmüller G & Klein CA (2001) Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients. *Semin. Cancer Biol.* 11, 307–311.

Rosário M & Birchmeier W (2003) How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 13, 328–335.

Rossi D & Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217–242.

Sahai E & Marshall CJ (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 133–142.

Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912–923.

Schmidt A & Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 13, 1587–1609.

Shevde LA & Welch DR (2003) Metastasis suppressor pathways—an evolving paradigm. *Cancer Lett.* 198, 1–20.

Siegel PM & Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.

Stacker SA, Achen MG, Jussila L et al. (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 573–583.

Steeg PS (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 3, 55–63.

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.

Thiery JP (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 740–746.

Vernon AE & LaBonne C (2004) Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr. Biol.* 14, R719–R721.

Wakefield LM & Roberts AB (2002) TGF-β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 22–29.

Weigelt B, Peterse JL & van't Veer LJ (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602.

Weiss L (1990) Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54, 159–211.

Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, & Rinker-Schaeffer CW (2000) Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1717–1730.

（赵晓航　孙玉琳　董乔梅　何　平　任传利）

第 15 章　集群调控：肿瘤免疫和免疫治疗

体内少量积累的肿瘤细胞可以发展，并且它们具有产生新抗原的潜能，激发有效的免疫学反应使肿瘤消退，这是不难想象的，但缺少临床依据。

Macfarlane Burnet，免疫学家，1957 年

在本书中，我们研究了机体对抗肿瘤生长的各种防御机制。许多防御机制是细胞中固有的，在它们复杂的网络调节环路中更具特异性。最明显的是通过凋亡机制对细胞进行调控，对失常或遭受某种损伤或生理压力下引发细胞的死亡进行平衡。pRb 通路和 DNA 修复系统同样地参与了阻止初始癌细胞的形成。

组织结构对初始癌细胞的增殖也具有约束作用。例如，正常上皮细胞失去原有位置进入基底膜而激活了凋亡形成，称为失巢凋亡。这个机制限制了上皮细胞偏离它们在正常组织内的位置，而在异位（即异常的部位）生长。同时，此特性也赋予了干细胞和它们的基因组，减少了突变肿瘤细胞在组织中发生的概率（12.3 节）。

除了这些细胞和组织特异的机制之外，哺乳动物可能有另一套防卫体系——免疫系统。免疫系统从我们的组织中高效地发现和清除外来的有感染性的病原体，包括病毒、细菌和真菌。在 20 世纪的后半叶，肿瘤研究的主要问题之一是免疫系统是否也能将癌细胞识别为外来者，并且消灭它们。

实际上，机体免疫系统多层次对抗肿瘤的确实证据在快速地积累。显然，从开始建立这种抗肿瘤防御形式存在多种困难：免疫系统有组织的从机体中识别和清除外来病原体，而自身组织却安然无恙。然而，肿瘤细胞源于机体，而且在许多方面与身体的正常细胞没有区别。癌细胞如何能被免疫系统识别，从而成为免疫介导杀伤的靶子？我们将在本章节反复地对这个问题和所涉及的各个方面进行阐述。

肿瘤免疫学领域与癌症研究的任何其他领域相比，在基本的观念上仍然存在很多的争议。因此，在这个章节中，你将会发现许多观察和结论与该书的其他章节相比，将来要进行修改。显然，由于它对于肿瘤发生的新探索和治疗人类肿瘤的新途径具有巨大的潜力，因此这是一个值得我们花时间去研究的癌生物学的领域。

过去 30 年内，对哺乳动物进行的研究已经揭示一个极为复杂和精妙的免疫系统。在我们进入讨论其抗肿瘤功能之前，需要先了解常规免疫系统的工作方式。要了解它的作用机制概况，至少先了解这章中的三个主要问题。首先，是什么特定的分子和细胞的机制使免疫系统能够认识并且攻击初始的肿瘤细胞？其次，这些免疫机制的确能有效地防止肿瘤产生吗？最后，一旦肿瘤已形成，肿瘤学家如何动员免疫系统去攻击肿瘤？（对免疫学的介绍位于 15.1～15.6 节；概况见图 15.14。）

15.1 免疫系统功能以复杂的方式破坏外来的入侵者和体内组织中异常细胞

哺乳动物的免疫系统启动数种攻击类型对抗外来感染物和被它们感染的机体自身细胞。通过识别这些病原体产生的特殊分子——抗原对它的靶目标进行鉴别。为此，免疫系统采用中和或破坏有传染性的粒子（细菌和真菌细胞、病毒颗粒），以及被感染的显示这些抗原的细胞。同样，它可扩展到免疫系统防卫肿瘤作用的范畴。一种假设是机体采用除去外来感染物的许多相同机制来防御肿瘤。

最熟悉的免疫学防卫策略涉及的体液免疫反应——免疫系统的一个分支，它产生能够特异识别和结合抗原的可溶性抗体分子（图 15.1）。因此，病毒颗粒或显示在细菌的表面上的抗原能快速地被抗体分子包被、中和（图 15.2）。

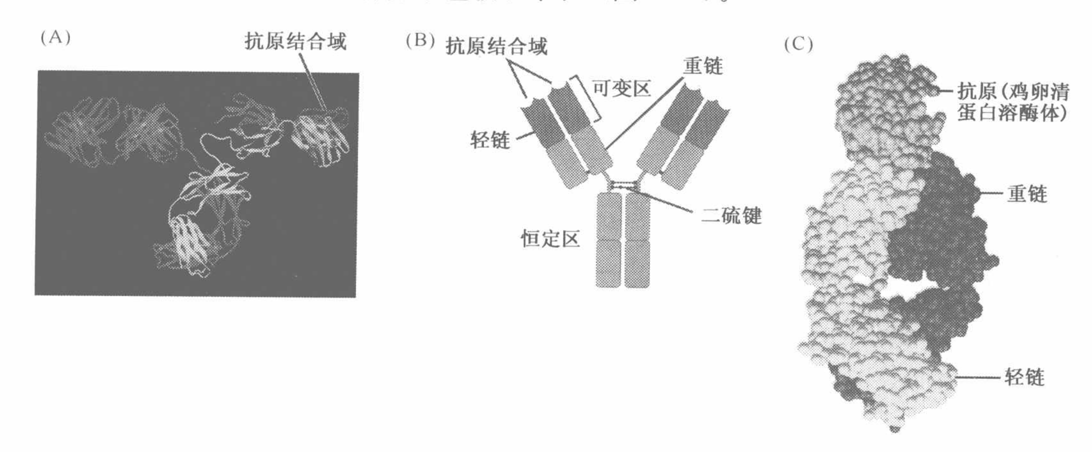


图 15.1 抗体分子和它们结合抗原的结构 血浆之中最丰富的抗体分子是免疫球蛋白 γ（IgG）分子。(A) X 射线结晶衍射图揭示了 IgG 分子的对称性，有两个抗原结合区（左上端，右上端）可同时结合两个抗原分子。(B) IgG 分子分为两个功能区。一个区域是用于识别和结合抗原分子。因为血浆中的 IgG 分子本质上可识别无限数量的抗原分子，IgG 分子的抗原结合部位具有多样性结构，称为它们的可变区（红色），来识别多样性的抗原。IgG 分子的其他部分称为恒定区（蓝色），并且在特定亚型的所有 IgG 分子中是不变的，如所有的 IgG1 分子。整个 IgG 分子是由两条轻链（L）和两条重链（H）组成的异四聚体。显示出两个单独的抗原识别和结合的口袋（左上端，右上端），每一边都是由 H 和 L 链的 N 端组成（凹陷型）。(C) 在这个空间充填分子模型中可以看到详细的抗原抗体复合物结构，其中重链（紫色）和轻链（黄色）的抗原结合区接触抗原分子，本例抗原为鸡卵清蛋白溶酶体分子（浅蓝）。这里仅显示了 H 和 L 链的可变区部分（谷氨酸残基，红色，显示对于抗原抗体分子氢键结合是重要的）。(From C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005.)

同样，一个被感染的细胞，可将感染物生成的抗原显示在细胞表面上，而且，它的表面可以被抗体分子包裹，进而可被吞噬细胞识别、吞噬和消灭，如巨噬细胞；或被细胞毒性细胞杀死，如自然杀伤细胞（NK）（图 15.3）。重要的是，这些免疫细胞自己不具有识别特异外来抗原的能力。得以替代的是，结合于病毒、细菌、哺乳类细胞表面抗原的抗体分子能使这些免疫细胞接近靶目标，并消灭它们。

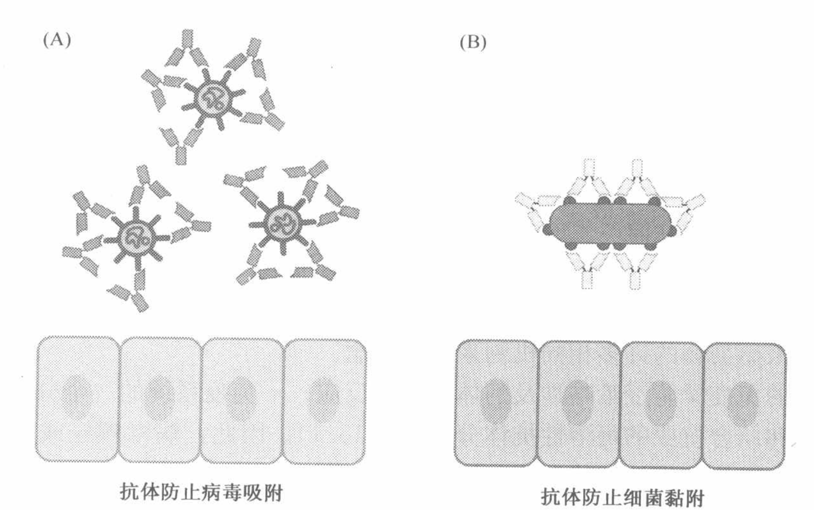
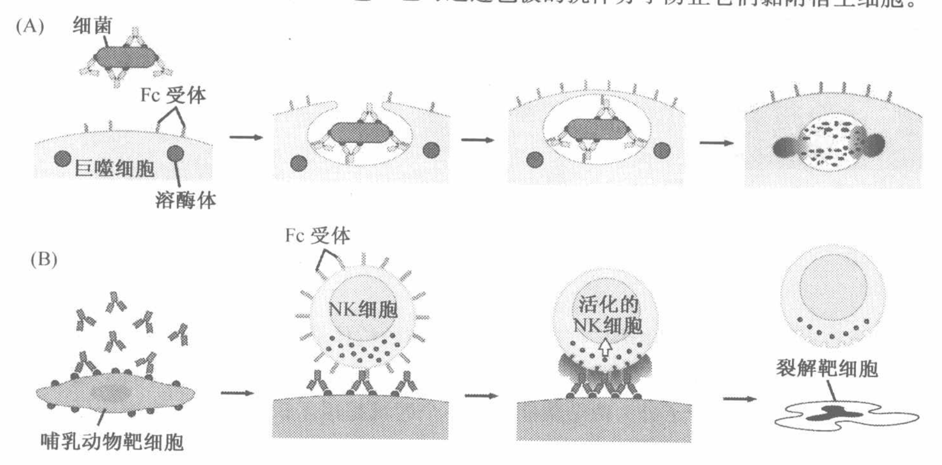


图 15.2　抗体分子的中和作用　(A) 病毒感染宿主的免疫系统产生的抗体可结合病毒颗粒（红色）。通过这种包被中和（灭活）病毒颗粒的感染活性，封闭了病毒附着宿主细胞的能力。(B) 同样，细菌显示某些表面抗原（红色）也可通过包被的抗体分子防止它们黏附宿主细胞。



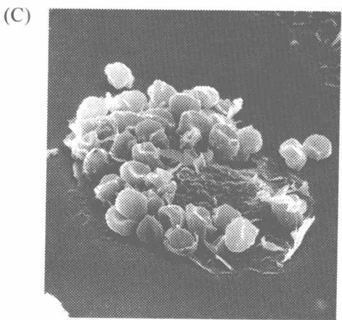


图 15.3　病原被抗体包被并由免疫系统的效应细胞清除　抗体分子结合的病毒、细菌和哺乳动物细胞通常是被免疫系统的细胞毒性细胞吞噬和破坏的前奏。(A) 抗体（黄色）结合的细菌（红色），通过巨噬细胞表面上的特殊受体，称为 Fc 受体（绿色），识别并结合抗体的恒定区（并不涉及抗原识别区）而激活巨噬细胞（见图 15.1）。这通常引起巨噬细胞吞噬抗体包被的细菌，并且在其胞浆内的溶酶体中被完全消灭。(B) 哺乳动物的细胞（灰色）被那些识别并结合于细胞表面抗原（红色的）的抗体分子（蓝色的）包裹。一种称为自然杀伤细胞（NK）通过细胞表面的 Fc 受体（绿色的）结合于抗体分子的恒定区。这种结合使 NK 细胞活化，其释放的细胞毒性的颗粒（紫色的点）进入靶细胞，使其遭受破坏。(C) 羊红血球被识别它们的表面抗原的抗体处理。如扫描的电子显微图像所见，它们大部分已被巨噬细胞通过其表面的 Fc 受体所吸附。(A and B, from C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005; C, from J. Swanson, University of Michigan.)

免疫系统的另一分支涉及细胞免疫反应。这种免疫反应是预存的，由免疫系统产生的特异性细胞毒细胞，它们自己能识别和直接攻击在表面显示某些抗原的其他细胞。

在这种情况，不需要可溶性抗体作为中间介导者去识别由靶细胞展示的抗原。因为细胞毒性T淋巴细胞（CTL）系统已发展了由它们自己T细胞受体（TCR）去识别抗原的机制。CTL应用T细胞受体去识别具有特殊抗原的细胞，并且靶向破坏这些细胞（图15.4）。

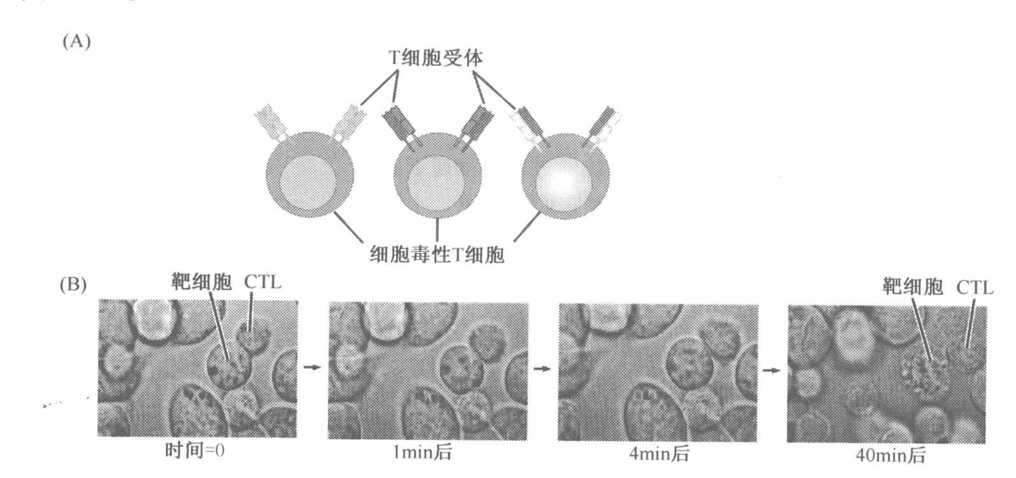


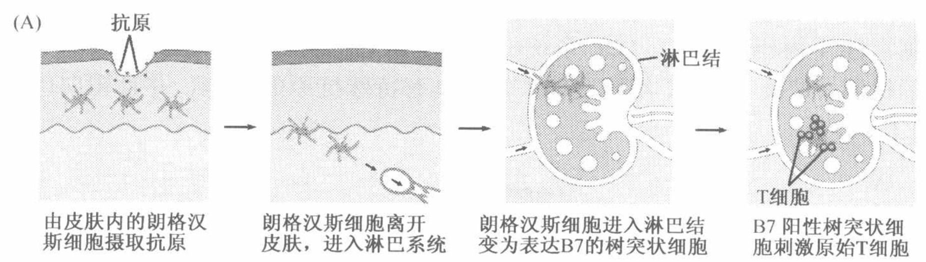
图15.4 细胞毒性T淋巴细胞 免疫反应的细胞分支引发细胞毒性细胞的形成，如细胞毒性T细胞（Tc's，CTL）可以识别和杀伤在表面显示某些抗原的其他细胞。(A) CTL在其表面产生抗体样的分子，称为T细胞受体（TCR）。在免疫系统发展过程中显示出不同排列的TCR，类似于产生多样性的可溶性抗体。每个CTL展示一种特异的识别抗原的TCR。(B) 这里显示了CTL（第一个图，右上方，）已经通过TCR去识别和结合靶细胞（在它左下方对角）。这些CTL（红点）内的细胞毒素颗粒在开始几分钟后移到杀伤细胞和靶细胞之间。经过40min，这些颗粒（如颗粒酶；见第9.14节）已进入靶细胞内。靶细胞已经进入凋亡期，并且开始裂解。（From C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005.）

我们也能从另一个视角描述免疫系统：免疫系统对感染的病原体（如病毒的特定株）和它的抗原的许多免疫反应依赖于之前曾遇到过的相同的病原体。这些免疫系统是通过初次相遇去识别这些微生物显示的某些抗原而受到训练，当再次遭遇它们时会产生强有力的反击；这种现象称为适应性免疫反应。同时，免疫系统的其他细胞自然地参与了反应，它们不需要预先遇到暴露抗原和训练即可识别某些感染物和异常细胞；这种生来具有的能力称为固有免疫反应。例如，前面所述的NK细胞具有识别异常细胞显示的特殊的细胞表面分子，甚至此前没有遇到过这些细胞。

15.2 适应性免疫反应诱导抗体产生

当感染性颗粒或者非正常的细胞被免疫系统特殊的吞噬细胞，特别是巨噬细胞和树突状细胞（DC）吞入时，适应性免疫反应即开始了（图15.5）。摄取这些物体或碎片后，吞噬细胞转变了任务，进而将被摄取的物质呈现给免疫系统的其他细胞成分。这些

细胞更为特异地将它们已经摄取颗粒有关的系列抗原告知免疫系统。在吞噬抗原后，这些吞噬细胞迁移到淋巴结内，表达被吞的抗原。下面将详细讨论，在淋巴结内抗原被呈递给各种类型的 T 细胞。



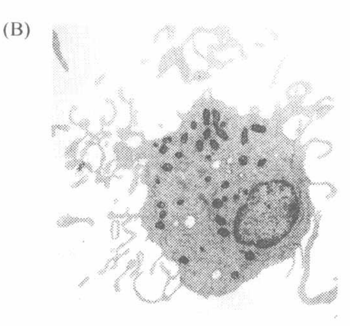


图 15.5 树突状细胞的抗原呈递 免疫系统通过抗原呈递细胞（APC)，特别是树突状细胞来识别感染物和它们的抗原。(A) 位于皮肤内专职的吞噬细胞（即 Langerhans 细胞，黄色）通过吞噬摄取抗原（红点），然后移动到淋巴结（浅蓝色），在这里它们成熟为树突状细胞。在淋巴结内，这些细胞将其呈递的抗原展示给 T 细胞（深蓝圈）；活化的 T 细胞，进而产生了针对细胞和病毒显示抗原的特异性免疫反应。(B) 树突状细胞的名字是取自于这些细胞延伸出众多手臂。(From C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005.）

为了训练免疫系统，这些抗原呈递细胞（APC）首先消化被它们吞噬的（即直接吞入）或者内吞（也就是，经由细胞表面受体结合，然后内化）的颗粒。在专门的细胞质的小泡中进行消化，将内化的蛋白质切割成 18～22 个氨基酸长短的寡肽。然后这些寡肽结合到主要相容性复合体（MHC)II 类分子上，后者通过它们的路径到达 APC 的表面（图 15.6）。更明确地显示，寡肽片段附着在 MHCII 类分子的抗原呈递区域（图 15.7A）（在人类中，MHC 分子通常被称 HLA 或人类的白细胞抗原或分子，但是，在这一个章节各处提及的人类和小鼠的这个类型分子我们将使用更为广泛的名称 MHC)。

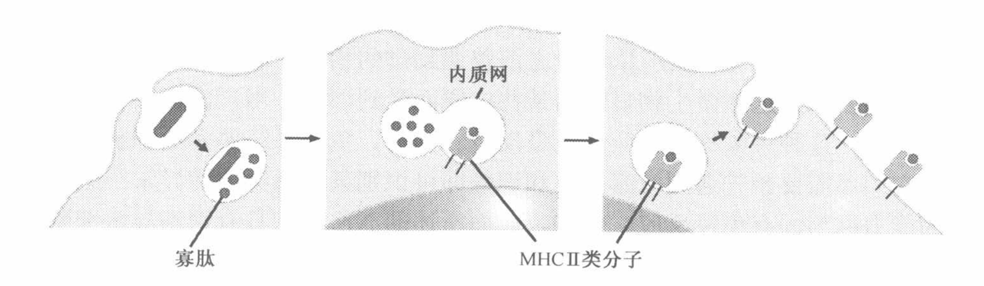


图 15.6 由抗原呈递细胞处理抗原 吞噬细胞，特别是树突状细胞和巨噬细胞将潜在抗原颗粒（红椭圆形）内化后，由蛋白水解酶将其切割成寡肽（红点）。然后，产生的寡肽附着在内质网内 MHC II 类分子中，再移到细胞表面，使 MHC II 类分子在细胞表面展示寡肽片段，并在淋巴结内向 T 细胞呈递寡肽片段。(From C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005.）

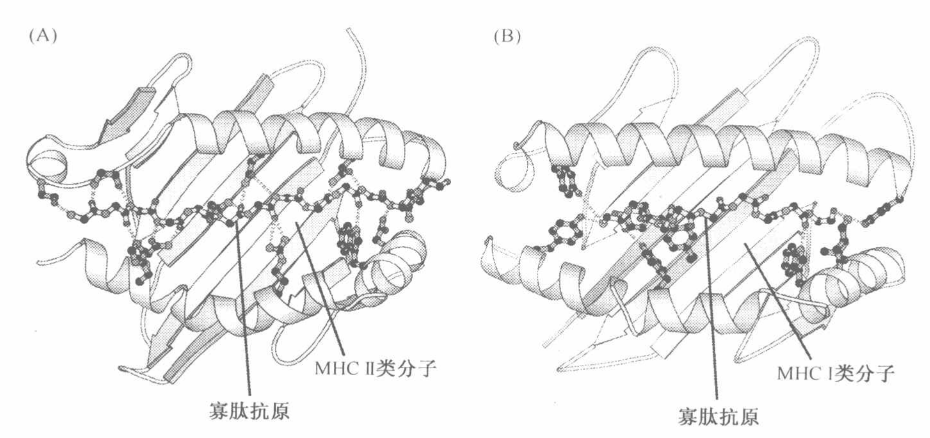
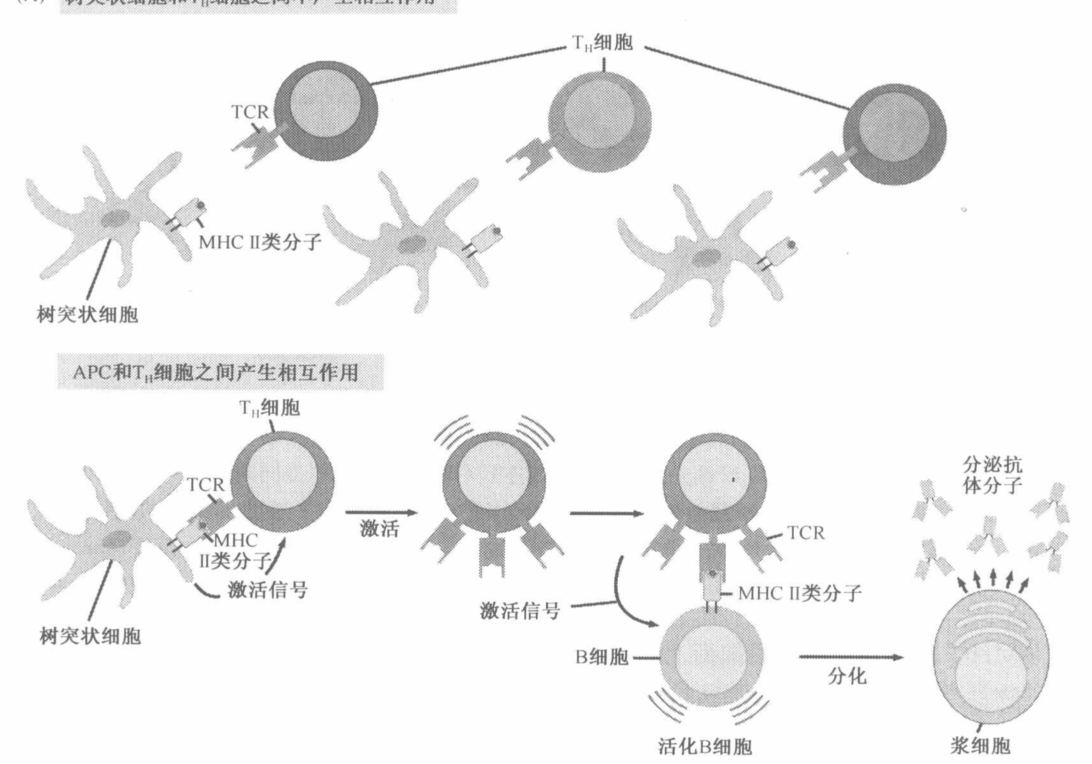


图 15.7 MHC 分子的抗原呈递 (A)这里显示的 MHC II 类分子的抗原呈递凹槽结构是由 X 射线晶体衍射图确定的。寡肽抗原(棍状彩图)通过氢键结合到 MHC 分子(带状图)的凹槽中，其 N 端连到左侧，C 端连到右侧。寡肽抗原连同附近 MHC 分子的氨基酸残基一起形成被其他免疫细胞识别的分子的结构，例如，通过 T 细胞的受体去识别。(B)一个排列特征非常相似的 MHC I 类分子抗原呈递区的结构。(From C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005.)

MHC II 类分子功能很像街上叫卖的小商贩手中拿着物品向路人展示。在这种情景下，物品是被 APC 捕获的寡肽抗原，有意的顾客是免疫系统的其他细胞，特别是一类称为辅助性 T 细胞(T_H细胞)的细胞，通常称为 $CD4^+$ 细胞，它们展示一种特异的细胞表面抗原(图 15.8)。因为巨噬细胞和树突状细胞专门应用它们的 MHC II 类分子呈递来自它们的环境中摄取的抗原，免疫学家有时称它们为“专职的”APC，有别于其他不能专门进行这类抗原呈递的细胞类型。

注意：它是通过 II 类分子外功能区(这个“手掌”)和它们结合的呈现给辅助性 T(T_H)细胞的寡肽抗原(“货物”)形成联合的分子结构(图 15.7)。抗原呈递给某些 T 辅助细胞，然后依次激活 B 细胞产生特异识别和结合独特抗原的免疫球蛋白(抗体)分子(图 15.8)。伴随着这些 B 细胞的成熟产生了一群细胞(称为**浆细胞**)，它们活跃地将特定的抗体类型分泌到循环中。这些抗体分子特异地识别和结合原来触发这一系列反应的特定抗原。树突状细胞一旦具有 APC 功能，也能激活细胞毒性 T 细胞(未在图 15.8 中显示)。

在胞外区遇到感染的病原体(如病毒颗粒、细菌和霉菌)时，这个系统运作得很好。因此，这些感染的病原体可被专职抗原呈递细胞内化，并且这些被摄取的来源于微生物衍生的肽可以再度表达于外部空间。由于这些抗原的表达最终使 B 细胞和它们的后代产生抗体分子。这些抗体分子可以识别，并结合感染的颗粒，从而中和它们(见图 15.2)。我们可以设想，通过同样的方式，肿瘤细胞在它们的表面显示某些特定蛋白也可以激起免疫系统的抗体反应，并通过抗体结合这些细胞表面的抗原分子而将其包被。



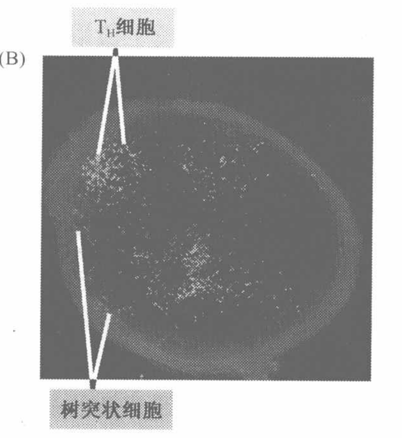


图 15.8　免疫细胞在淋巴结内相会　在淋巴结内，树突状细胞直接与辅助性 T 细胞相互作用，并将抗原呈递给它们。(A) 在淋巴结内，树突状细胞吞入、加工抗原（红点，见图 15.6），并在其表面将抗原性的寡肽片段通过它们的 MHC II 类分子（灰色）呈递给 T 细胞。在这里，树突状细胞与一些 T 细胞（上面），后来称为辅助性 T 细胞（T_H）相遇。它们每个细胞都在其表面显示自己独特的 T 细胞受体（TCR；绿色）。然而，最初三个相遇中没有一个 T_H 细胞的 T 细胞受体识别并结合被树突状细胞的 MHC II 类分子呈递的寡肽抗原。但有时，树突状细胞成功地发现 T_H 细胞，其 T 细胞受体确实识别被树突状细胞的 MHC II 类分子呈递的寡肽抗原（下方）。这使 T_H 细胞被激活；T_H 细胞离开树突状细胞，并且继续寻找在其表面也由 MHC II 类分子呈递相同抗原的 B 细胞。当或假如 T_H 发现这种 B 细胞（浅黄色，第二图的右侧），它会激活 B 细胞，促其增殖，并分化为具有释放能够识别这些寡肽抗原的抗体分子的浆细胞（浅棕色）。(B) 多光子显微镜（multiphoton microscopy）显示小鼠淋巴结的囊膜（蓝色）和最先到达的一些染料标记的树突状细胞细胞（红色），以及染料标记的 T 细胞（绿点），树突状细胞将要把抗原呈递给它们。在淋巴结内，两者之间被相互隔离，并且，它们在淋巴结内运行和相互作用仍然缺乏了解。T_H 细胞从静脉循环中到达淋巴结，并且通过渗出血管外寄宿在淋巴结内（信息栏 14.3）。(B，From T. R. Mempel，S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian，Nature 427：154-159，2004.)

抗体包被的细胞或感染的微生物可引起另一种类型的免疫攻击：在血浆中称为补体的一组蛋白，通过识别连接在细胞（包括细菌、真菌和哺乳动物细胞）表面的抗体分子的稳定区，结合于这些抗体分子上，并且继续在浆膜附近打孔，从而杀死这些细胞（图15.9）。

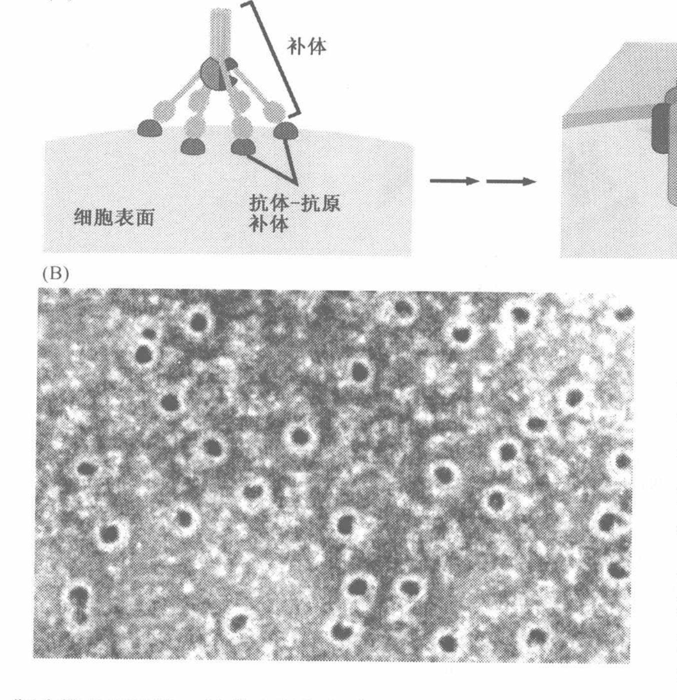


图 15.9　补体介导的杀伤　(A) 抗体分子结合到细胞表面抗原（左侧）上形成的抗原抗体复合物（红球）可吸引存在于血浆中的补体蛋白（黄、绿、紫色），并诱导它们形成复合体，通过系列步骤在细胞浆膜上（右侧）抗原抗体最初形成复合物的附近形成补体蛋白通道。(B) 见这张电子显微图片中，产生的通路破坏了浆膜防御功能的完整性，并快速引起细胞死亡。(From C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005.)

这些引起适应性体液免疫反应的系列步骤，告诉了我们一些重要的有关诱导免疫反应，作为免疫原的抗原分子结构：它们不是完整的蛋白质，而是来自切割许多大蛋白产生的寡肽片段（见图 15.6 和 15.7）（除此之外，某些复杂的碳水化合物链和连接的侧链，它们在某些情况下也具有免疫原性）。

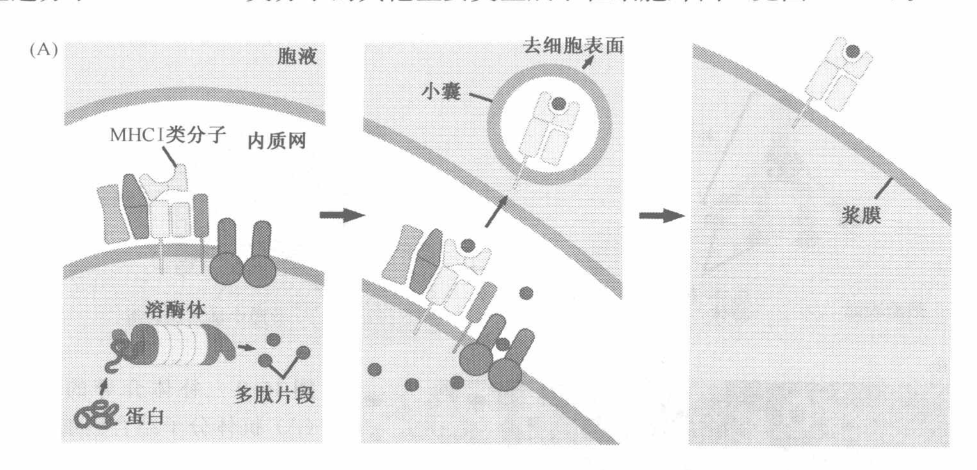
15.3　引起细胞毒细胞形成的另一种适应性免疫反应

上面描述的免疫学反应不能有效地对抗那些已进入细胞内感染的病原体，因为浆膜屏蔽了对它们的监视。同样在肿瘤细胞中，体液免疫反应系统不能识别隐藏在这些细胞深处的异常细胞蛋白。原则上讲，这种屏蔽将产生严重的免疫学难题，它们除承担监控胞外空间和细胞表面的任务之外，还需要监控在细胞内将要发生的问题。

这个难题是通过抗原呈递机制被解决。其一是通过上述的专职抗原呈递细胞（APC）的作用。实际上第二种其他抗原呈递机制是更为普遍的，因为全身绝大多数细胞都采用。

它的处理过程如下（图 15.10）：首先在细胞内合成蛋白的一部分（通过计算，约

占细胞内的 1/3）常规地转送给专门的溶酶体。在这里，这些蛋白被降解成寡肽。然后，8～11 个氨基酸残基长的降解产物附着在 MHC 分子上被传送到细胞表面，通过抗原呈递分子——MHC Ⅰ类分子的其他主要类型展示在细胞外面（见图 15.7B）。



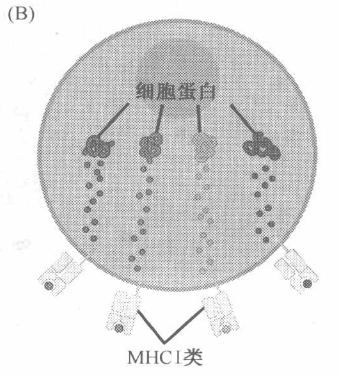
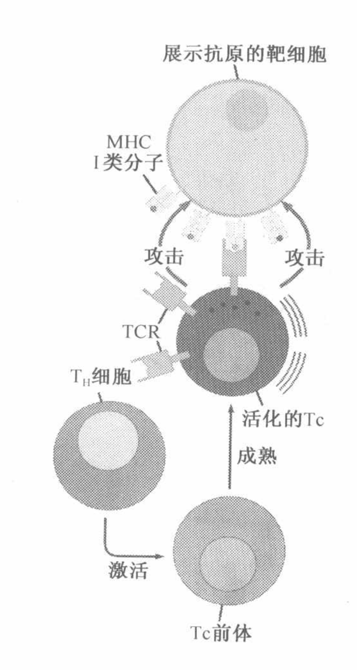


图 15.10　MHC Ⅰ类分子展示胞内抗原　几乎全身所有细胞类型，包括肿瘤细胞它们近期合成的蛋白常规地转入抗原呈递系统。(A）一些近期在胞浆中合成的蛋白转送给溶酶体（紫色、黄色），在这里它们被降解成寡肽（红点）；然后，产生的寡肽送入内质网，与可遇到的 MHC Ⅰ类分子（黄色）紧密结合（见图 15.7B）。这将使多蛋白复合物通过囊泡传送到细胞表面，从而展示由胞内合成的免疫系统的蛋白片段。这些抗原展示的全部过程同 MHC Ⅱ类分子类似（见图 15.6）；然而，MHC Ⅱ类抗原的呈递是特异由“专职的抗原呈递细胞”执行的，如巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞，而 MHC Ⅰ类分子呈递几乎是被机体中所有细胞类型所采用。(B）来自于大量细胞蛋白（这里表示的是四种不同的蛋白片段）的广谱寡肽片段被细胞应用 MHC Ⅰ类蛋白同时展示。（A，from C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005.）

由 MHC Ⅰ类分子展示的这些肽包括了细胞正常合成的，以及由外来感染病原体在胞内制造的，如病毒和细菌。这种内部抗原在外部展示是常规不断地发生，不论是否为外来抗原只要存在于细胞内即可。

某些寡肽抗原在细胞表面被展示（通过它的 MHC Ⅰ类分子）可以吸引细胞毒性 T 细胞的注意（Tc's，也称为细胞毒 T 淋巴细胞、CTL 或 $CD8^+$ 细胞），进而被这些细胞杀伤（见图 15.4）。这种杀伤的起源可以追溯到辅助性 T 细胞的作用。回顾一下，有些辅助性 T 细胞能够通过与抗体产生的 B 细胞相互作用和刺激，来激活体液免疫反应（见图 15.8）。现在，我们来看看第二种独立功能的辅助性 T 细胞：其中一些可辅助对细胞毒性 T 细胞的活化，使其特异性识别和杀伤表达最初激活免疫反应的特殊寡肽抗原的靶细胞（图 15.11）。这种细胞毒性淋巴细胞对抗原展示细胞的攻击描绘了细胞方面的适应性细胞免疫反应。

图 15.11　辅助性 T 细胞激活细胞毒性 T 细胞　除了诱导 B 细胞产生抗体分子（图 15.8）之外，辅助性 T 细胞（T_H）第二种亚型（蓝色）可以刺激细胞毒性 T 细胞的前体（浅红，底上）成为活化的细胞毒性 T 细胞（称为 Tc's 或 CTL，红色），可应用它们的 T 细胞受体（TCR）识别并结合由全身所有类型细胞表面 MHC I 类分子呈递的抗原。这种识别使显示抗原的细胞（灰色，顶上）受到攻击，如图 15.4B 显微图像显示的。Tc's 通常应用含有穿孔素和粒酶的细胞毒颗粒（黑点）去杀伤靶细胞（图 15.12）。



辅助性 T 细胞能够促进体液和细胞两方面免疫反应发生的能力，反映出 T_H细胞的不同亚群能够产生和释放可溶性的称为细胞因子的免疫分子：促进体液免疫反应（通过刺激 B 细胞）的 T_H's 产生白细胞介素-4（IL-4），而促进细胞介导的免疫（通过刺激细胞毒性 T 细胞）的 T_H's 分泌干扰素-γ（IFN-γ）。

细胞毒性 T 细胞通过两种不同的机制杀伤它们的靶细胞。它们可以向靶细胞释放某些毒性蛋白（图 15.12A 和 B）。其中之一是穿孔素，在靶细胞的浆膜上打孔，然后由细胞毒性细胞释放的颗粒酶通过这些洞进入到靶细胞的胞浆。如前面所述（9.14 节），一旦进入靶细胞的胞浆内，颗粒酶切割，并且激活前凋亡蛋白 caspase。

在 9.14 节中讨论中涉及 Fas 死亡受体的第二种杀伤机制，Fas 表达在全身许多细胞的表面。细胞毒性 T 细胞可表达针对靶细胞 Fas 受体的配体，称为 FasL。然后，FasL 活化了靶细胞表面的 Fas 死亡受体，从而激活它们外来的凋亡途径（图 15.12C）。

在限制病毒感染传播方面通过细胞毒 T 细胞的杀伤可能起到重大作用。例如，近期感染的病毒活跃复制的细胞，应用它的 MHC I 类分子展示来自降解病毒蛋白的寡肽。这种抗原展示对免疫系统发出警告，这种异常蛋白产生于细胞内部。如果免疫系统功能正常，它的细胞毒性 T 细胞将识别由这些细胞的 MHC I 类分子展示的病毒寡肽，并且在病毒繁殖和释放子代颗粒之前杀死这些细胞。

这意味着，免疫系统确实运用两种适应性免疫反应限制病毒感染：细胞反应是杀伤病毒感染的细胞，而体液免疫反应是用抗体分子包被中和已被释放到细胞外，包括循环的病毒颗粒（见图 15.2A）。由此得知，在通过免疫系统阻断病毒诱导肿瘤的发生方面，抗病毒反应具有重大意义。

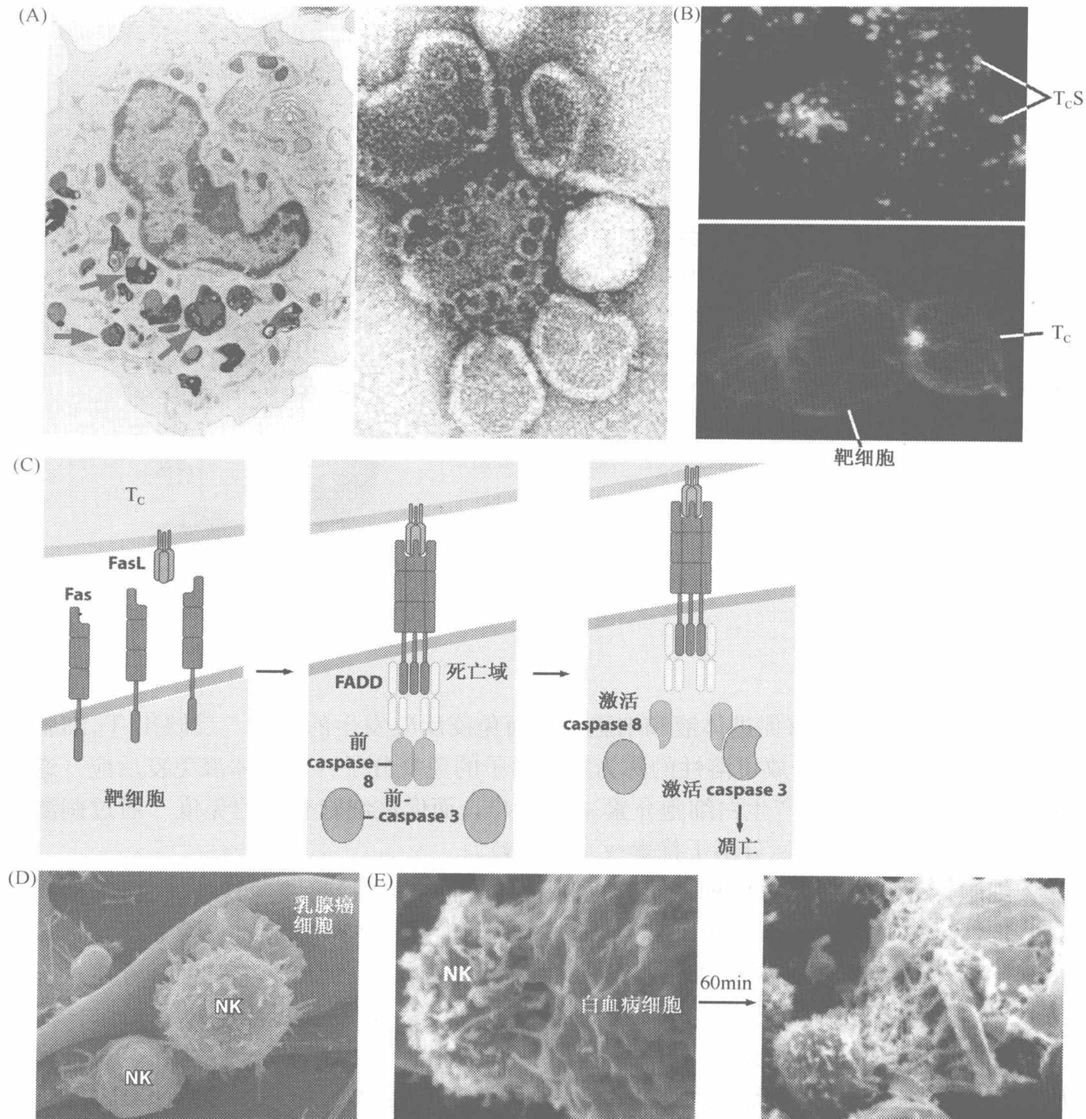


图 15.12 细胞毒性淋巴细胞杀伤细胞的机制 (A) 这个细胞毒性 T 淋巴细胞（Tc，CTL）电子显微图像显示了细胞质内（粉色箭头，左图）的系列裂解颗粒。当与靶细胞接触时（这些靶细胞最初由 Tc 的 TCR 识别的），这些颗粒释放穿孔素，在靶细胞浆膜上形成柱形通道（中间细胞，右图）；然后，前凋亡蛋白，如颗粒酶（9.14 节），也是由溶酶体颗粒运载的，通过这些通道进入靶细胞的细胞质，在这里通过解离天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶原（procaspase）启动凋亡程序。(B) 在缺乏靶细胞时，含有穿孔素和粒酶的裂解颗粒（绿色、黄色）分散在细胞毒性 T 细胞（Tc；上图）的细胞质中 。在下图，靶细胞形成突触（左侧），并且裂解颗粒已聚集在此处准备杀伤靶细胞。(C) 由 Tc（上面，红色）杀伤细胞的另一种机制通过它所显示的 FasL（橙色）进行靶向破坏。FasL 是一种三聚体，它结合靶细胞（下面细胞，灰色）展示的 Fas 受体（棕色），并且触发受体成三聚体化后，在靶细胞内通过连续激活 caspase 8 和 3（图 9.31）引起外来的凋亡程序的激活。(D) NK 细胞程序性的识别和杀伤其他细胞，包括肿瘤细胞，这些细胞表面不能显示正常水平的 MHC I 类分子。这张扫描电子显微图片（SEM）显示了 NK 细胞（绿色），其中之一在攻击的最初阶段已经展开它的部分细胞质覆盖在人乳腺导管癌细胞上。(E) 这张 SEM 显示 NK 细胞（左图，较小的细胞）对白血病细胞的初始攻击。60min 后，在这个攻击反应中，NK 细胞已扩大了白血病细胞浆膜的损伤，其细胞膜已破溃并且已卷起（右图）。(A，C，and E，from C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005；B，from R. H. Clark，J. C. Stinchcombe，A. Day et al.，Nat. Immunol. 4：1111-1120，2003；D，courtesy of S. C. Watkins and R. Herberman.)

15.4　固有免疫反应不需要预先致敏

地球上99%的动物种类不具有适应性免疫反应来防御病原体的攻击。它们依靠固有免疫学的反应进行保护。重要的是这种远古的、广泛分布的固有免疫系统在动物进化过程中已经被保存，并且在各种各样的免疫学反应中继续起到关键的作用。

固有免疫反应的细胞成分能够识别并且攻击外来的病原体和异常细胞，而且未经过预先暴露给这些物体进行“诱导”。因此，这些免疫细胞在体内的组织中“本能地”认识异常细胞，如癌细胞，并且攻击和破坏这些靶细胞。细胞介导的固有免疫不是识别特异抗原，而是识别表达在感染病原体（或者转化细胞）的表面上特有的分子模式，而正常细胞不具有该模式。

固有免疫反应的主要成分是自然杀伤（NK）细胞。可能许多免疫系统与癌细胞初次相遇时由 NK 细胞产生作用。稍后我们将会更为详细地讨论，NK 细胞识别广泛的癌细胞类型显示在细胞表面的蛋白质结构。因此，NK 细胞是“预先规划好的”去识别癌细胞，并从机体组织中清除它们。除了 NK 细胞之外，至今固有免疫系统的其他细胞成分，包括巨噬细胞和中性粒细胞，可能参与了对抗癌细胞的固有免疫反应。

通过识别和攻击靶细胞启动了固有免疫反应的 NK 细胞（图 15.12D 和 E）之后，它发出细胞因子信号，特别是干扰素-γ（IFN-γ），来征募包括巨噬细胞在内的其他的免疫细胞到攻击的位置。第二次免疫反应的浪潮通常使免疫系统以特异的适应性体液免疫和细胞免疫反应方式产生更加精确和更为有效的反应。例如，通过适应性免疫反应可以动员大量的细胞毒性 T 细胞去有效地杀伤肿瘤细胞。

15.5　产生免疫耐受需要区分自己和非己

免疫系统被精密地调节，并具有高度特异性。它必须能非常精准地区分外来蛋白（如那些入侵感染的病原体产生的蛋白）与体内自身细胞正常产生的蛋白。推论，假如体内一个正常细胞展示的寡肽与免疫系统常规遇到的相似或相同，它在免疫系统各种武器面前将是安全的，表现为一种免疫耐受。事实上，免疫耐受是当前存在于免疫学研究中的难题：免疫系统如何学会从机体正常的所有蛋白中鉴别外来蛋白和肽？免疫学家通常将这种行为视为免疫系统区别“非己”和“自己”的能力。

在免疫系统的发育过程中多种运行机制确保清除识别自身抗原的任何 T 或 B 细胞。换言之，如果这些细胞逃逸，它们的活动将被强烈的抑制。如果在体内淋巴细胞库中不能清除这些自体反应或自身反应的淋巴细胞，这些残存的免疫细胞可将自身正常的组织细胞作为靶子。事实上，自身反应细胞就是这样做的，打破这种耐受可以引起自身免疫病，如类风湿关节炎、溃疡性结肠炎（ulcerative colitis）、红斑性狼疮，其中免疫系统驱使抗体和细胞毒性细胞攻击正常细胞和组织（图 15.13）。

免疫耐受引起一种简单的和显而易见的观点，将主导以下的讨论：免疫系统如何有意地对机体自身细胞产生耐受，而识别和攻击在生化水平方面与机体正常细胞非常相似的肿瘤细胞？假如它承担攻击肿瘤细胞，以及那些被肿瘤病毒转化的细胞，那么这些细

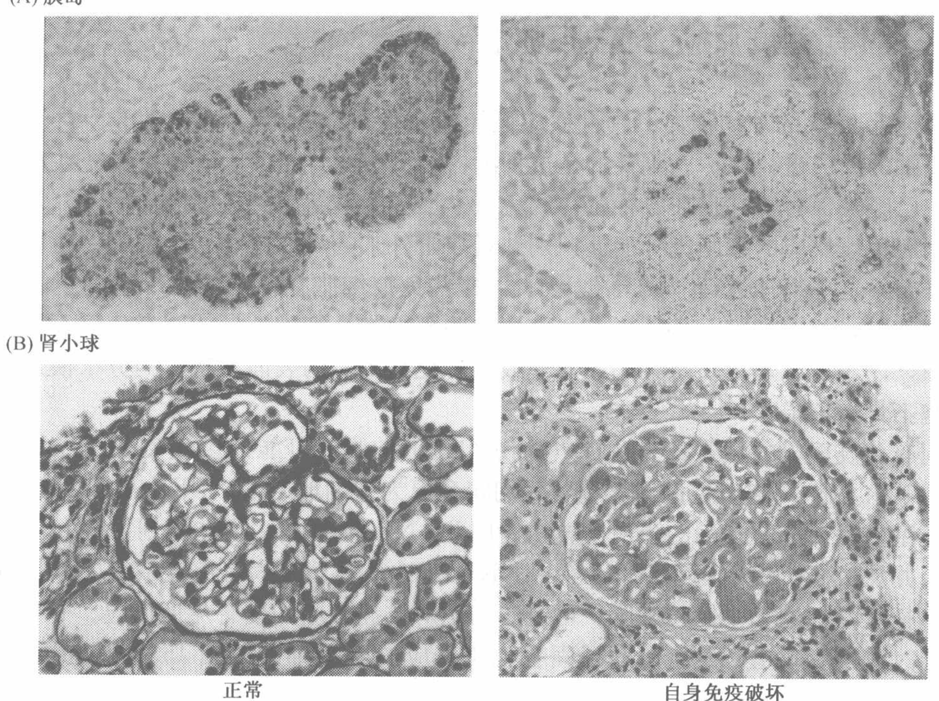


图 15.13 自身免疫攻击破坏正常的组织 已被激活的攻击身体正常组织的免疫系统可以造成大量的组织损伤。原则上讲，这里产生的同样的免疫学机制也能攻击和破坏恶性组织。(A) 在小鼠中（左图），正常的胰岛（即朗格汉斯岛）是由大量的分泌胰岛素的 β 细胞（浅棕色）和外围少量 α 细胞（深棕色）组成。由自身免疫攻击 β 细胞引起的糖尿病小鼠的胰腺中几乎已失去了所有的 β 细胞（右图）。(B) 在肾脏中正常的肾小球（左图中间）含有复杂的管道网络负责过滤血浆和产生尿。在系统性红斑性狼疮（SLE）疾病中，自身免疫攻击位于肾小球上皮细胞下的基底膜，引起抗体蛋白堆积和多种炎性细胞的浸润；总之，最终破坏了肾小球（右）的结构和肾脏功能。(A，from C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005；B，courtesy of A. B. Fogo.)

胞如何能逃脱并阻碍免疫系统的不同分支发起的攻击（补充材料 36 ◎）？

15.6 调节性 T 细胞能抑制适应性免疫反应的主要成分

始于 20 世纪 90 年代的研究已完整地描述了一个新的 T 细胞群，它们被称为调节性 T 细胞（T_{reg}细胞或简化为 T_{reg}）。表明它们存在的间接证据来自于对正常个体的观察，一种重要的细胞毒性 T 细胞（CTL）的群体，识别由 MHC I 类分子呈递的正常组织抗原——这一情况将直接引起对正常组织的免疫攻击和引发自身免疫病。然而，这种攻击并不发生，显然是通过一些未知手段抑制了这些细胞的作用。

T_{reg}的发现似乎在很大程度上解答了这个问题，由于这些细胞能够封闭分布在我们全部组织中的细胞毒性 T 细胞的作用。确实，在 T_{reg} 细胞遗传缺陷的小鼠中产生了致死性的自身免疫疾病；在不能产生 T_{reg} 的人中也已被证明发生同样侵略性的完全致命性的

自身免疫病。

像 T 辅助（T_H）细胞一样，T_{reg}在它们的细胞表面表达 CD4 抗原。然而，不同的是 T_{reg}还表达 CD25 表面抗原，并且，它们表达一种在其发展程序中称为 FOXP3 的转录因子。因为 T_{reg}表达抗原特异性 T 细胞受体（TCR；见图 15.4），它们可以特异地封闭那些具有识别同样抗原 TCR 的细胞毒性 T 细胞。此外，在淋巴结中，T_{reg}可以防止树突状细胞激活 T_H细胞。似乎 T_{reg}的抑制必须密切接近 T_H和 Tc，并且通常由 T_{reg}释放 TGF-β 和白细胞介素-10（IL-10）来抑制或杀伤其他类型的 T 淋巴细胞。

在 T_{reg}方面的研究仍处于初期阶段。然而，它们的行为可能涵盖着了解一些自身免疫病的关键。同时，T_{reg}的作用可以解释，为何许多类型的肿瘤细胞在大量 CTL 存在的情况下本应该能被清除，然而却能旺盛生长。该话题在本章后面将继续进行。

总的来看，至今我们已了解的免疫系统的各种成分被展示在图 15.14 中。

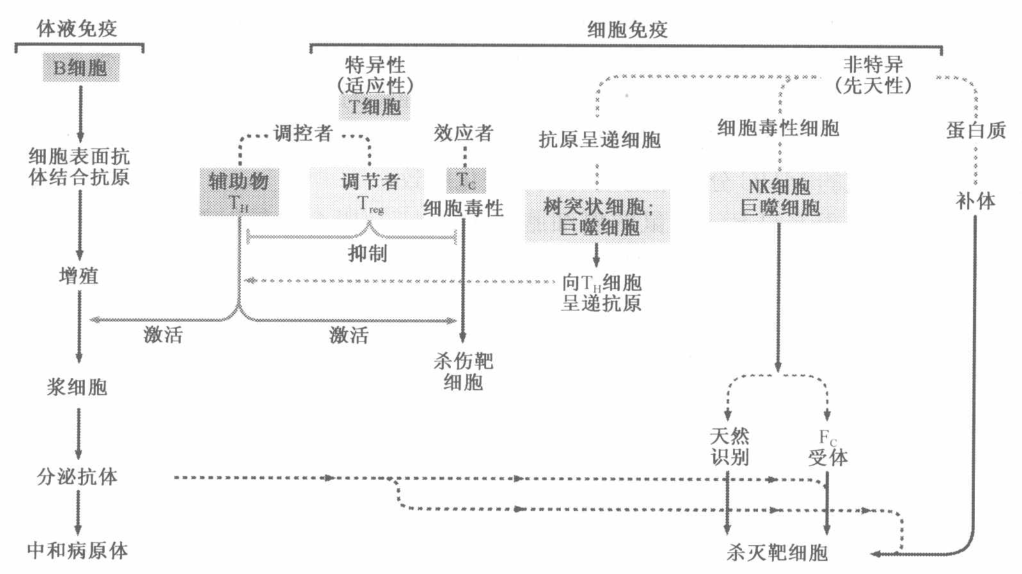


图 15.14　免疫系统的两大组成部分——体液免疫和细胞免疫　体液免疫（左）由 B 细胞驱动，它通过编码抗体基因的重排和位于抗体分子 V 区的抗原结合位点基因的多样性而产生几百万种具有不同抗原特异性的抗体。体液免疫反应需要辅助性 T（T_H）细胞来激活，而 T_H细胞需要在淋巴结预先由抗原呈递细胞，主要是树突状细胞激活。树突状细胞可以将蛋白加工处理成 T_H细胞的 T 细胞受体识别的寡肽，随后激活 B 细胞，并产生识别寡肽抗原的抗体。

细胞毒性 T 细胞（Tc，也称为 CTL）同样具有 T 细胞受体，CTL 依赖这些受体识别和杀伤表达同类抗原的靶细胞。Tc 细胞的活化也需要预先由 T_H细胞的激活。第三类表达抗原特异性 T 细胞受体的 T 细胞是调节性 T 细胞，通常称为 T_{reg}。它们在抑制 Tc 和 T_H细胞两者方面起到重大作用，从而防止免疫反应被不适当的激活，否则会打破耐受，产生自身免疫病。

这些适应性免疫的各种表现被固有免疫系统方面所增强（右）。固有免疫系统特定的细胞类型可辅助清除病原体和肿瘤细胞，而且预先不需要通过接触这些物体进行“诱导”。因此，NK 细胞可以通过识别癌细胞表面分子的异常结构而直接杀伤多种癌细胞；巨噬细胞不需要预先接触即可识别和杀伤多种位于细胞内的病原体。尽管巨噬细胞和 NK 细胞本身不能识别大部分细胞表面抗原，但是包被了抗体分子（适应性免疫反应产生）的靶细胞可以吸引巨噬细胞和 NK 细胞，它们通过 Fc 受体识别抗体分子的恒定区（C 区），进而杀伤包被抗体的靶细胞。同样，血浆中的补体成分也可以识别结合在细胞表面的抗体分子，并通过插入靶细胞膜形成通道而杀伤靶细胞。

15.7 免疫监视学说的产生和质疑

如这一章开头所暗示的，免疫系统防御对抗肿瘤是一个老的概念。在 1957 年 Burnet 和 Lewis Thomas 就有关免疫系统在监视组织中肿瘤的作用方面共同推论，首次提出并清楚地描述了肿瘤免疫监视的概念。

当时，人们认为细菌、病毒、真菌等感染性微生物具有较强的免疫原性，它们可以激发机体的免疫反应，并最终被免疫系统的不同分支完全清除。以此类推，机体的免疫系统很有可能在时刻监视机体组织中癌细胞的出现，一旦识别出癌细胞，顺理成章，免疫系统像对待外来入侵者一样，在癌细胞获得增殖并形成威胁生命的肿瘤之前消灭它们。

在 20 世纪 50 年代早期，测试的这种模型是不具权威性的。研究者将荷瘤小鼠的肿瘤移植给其他小鼠，结果肿瘤很快被破坏掉，而且有确凿的证据显示是活跃的宿主免疫系统所为。但不久就清楚了，这种破坏与肿瘤细胞的恶性本质无关，而是同种异体排斥反应的结果。推测，不同品系小鼠的细胞表面显示独特的遗传模板编码的主要组织相容性分子（MHC）（然而，在这种情况下，不是附着的寡肽抗原唤起的那种免疫反应，而是不同品系小鼠的 MHC 分子结构上的微小变化所致）。

例如，来源于 BALB/c 小鼠的癌细胞接种于 C57/BL6 小鼠时被识别为外来抗原（即具有组织不相容性），反之亦然（图 15.15）。当来源于 BALB/c 小鼠的癌细胞植入

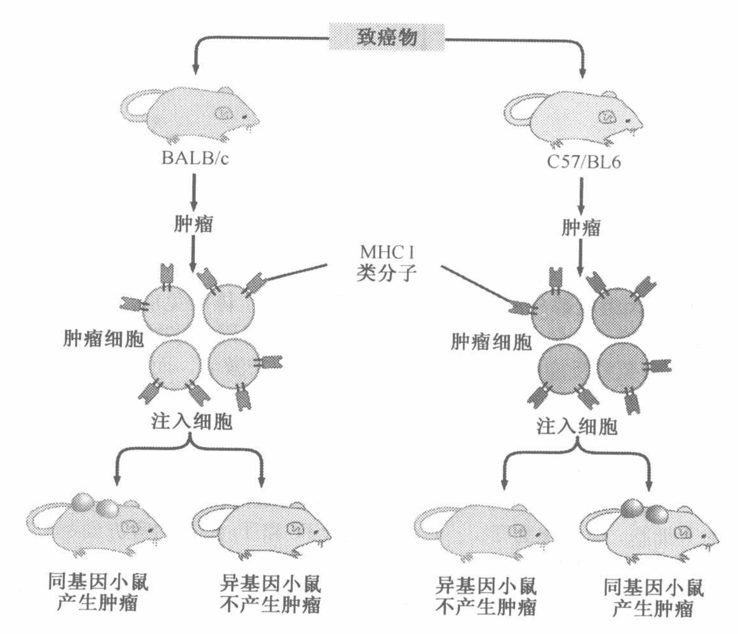


图 15.15 同系小鼠和 MHC 可变性 对近交系小鼠的研究揭示决定这些小鼠（包括哺乳动物）细胞免疫原性的主要是 MHCI 类分子。这些分子在同一物种中就具有高度的多态性，即一个个体（或一种小鼠的近交系）几乎总是具有不同于其他个体或品系小鼠的 MHCI 类分子（红、蓝细胞表面分子）。因此来源于 BALB/c 小鼠的肿瘤可以移植给同基因的小鼠，如另一只 BALB/c 小鼠身上，而不能移植到异基因的小鼠，如另一只 C57/BL6 小鼠身上，反之亦然。

BALB/c 小鼠时，即植入同基因宿主，确切地说，是与移植细胞具有相同的遗传背景和组织相容性抗原的宿主，因此，不会看到因不同的或同种异基因（遗传性差异）小鼠品系而产生的这些移植排斥反应［事实上，组织相容性（histocompatibility）这个名词即来源于所观察到的一种纯系小鼠的组织（“histo-”）能成功移植到同一遗传品系的其他小鼠身上，即意味着是“相容的”（compatible）］。

纵观对同种异基因肿瘤排斥的研究，可看到肿瘤免疫学年轻领域所走的弯路，因为对于小鼠或人的免疫系统怎样识别起源于自身组织的癌细胞来说是没有任何帮助的。尽管如此早期的研究工作确实揭示了重要的一点，即除了消灭细菌和各种各样的病毒，免疫系统也能破坏（视为非己）外源的哺乳动物细胞，或者说很可能破坏一些异常的细胞。另外，这些关于免疫功能的观察也可得出一个推论，即癌细胞不能从一个个体传播到另一个个体（见补充材料 37 ◎，图 15.16）。

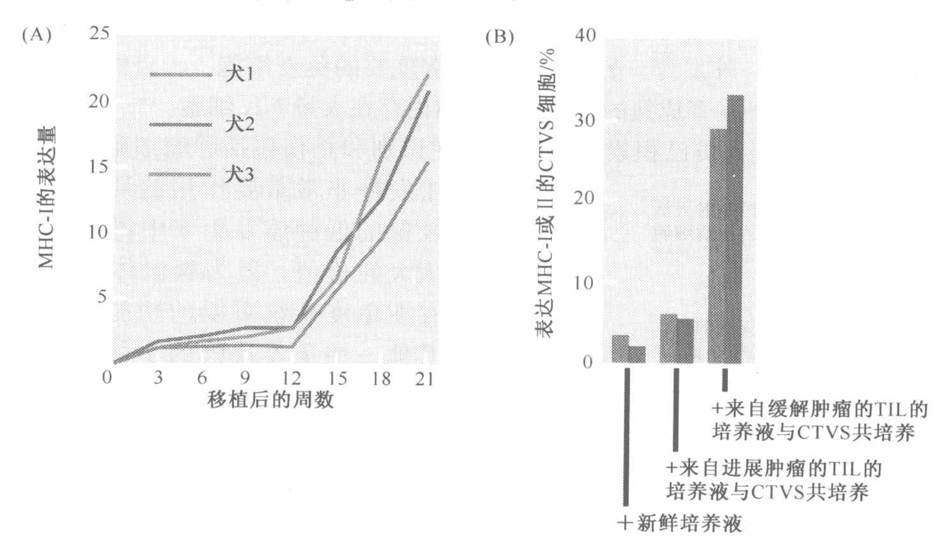


图 15.16　犬传染性性病肉瘤（canine transmissible venereal sarcoma，CTVS）的衰退和 MHC 抗原重新表达　CTVS 是肿瘤不能从一个生物机体传播到另一个机体理论的一个例外：这种肿瘤的细胞能通过性接触从一只犬传播到另一只。转移过去的细胞最初形成一个生长活跃的肿瘤，然而几个月后肿瘤却消退了（见补充材料 37 ◎）。(A) CTVS 细胞最初 MHC-I 类抗原的表达水平非常低，肿瘤生长 12 周后 MHC-I 类抗原重新开始表达，图示三只犬携带肿瘤 MHC-I 类抗原的表达情况。(B) CTVS 细胞重新表达 MHC-I 类抗原至少部分源于肿瘤浸润淋巴细胞（tumor- infiltrating lymphocyte，TIL）释放的信号。新鲜培养基对 CTVS 细胞 MHC-I 类分子（绿色）MHC-II 类分子（红色）的表达几乎没有影响（左）；来自于 1～12 周肿瘤中分离的 TIL 所释放的因子对 CTVS 细胞 MHC-I 类分子和 MHC-II 类分子的表达几乎也没有影响（中）；然而来自于 12～21 周的衰退肿瘤 TIL 所释放的因子能明显诱导 CTVS 细胞 MHC-I 类分子和 MHC-II 类分子的表达（右）。这种分子的重新表达现象看来应该是体内肿瘤的衰退的原因。（From Y. W. Hsiao，K. W. Liao，S. W. Hung，and R. M. Chu，J. Immunol 172：1508- 1514，2004.）

随之产生了研究免疫监视问题的其他策略。假如免疫系统真的能抑制肿瘤的出现，

那么免疫功能低下的动物将增加肿瘤发生率。这些起源于自身的肿瘤叫做自体肿瘤，当然，也可存在于具有同样组织相容性类型的动物组织中。在这些情况下，组织相容性（和不相容性）的问题被排除。

60年代末，免疫缺陷的裸鼠开始应用于肿瘤研究。这种小鼠缺乏有功能的胸腺——免疫系统中T细胞发育成熟的器官。它们还有另外一个不同的表型，缺少毛发，这也赋予了它们名字（见图3.13）。

随后于70年代早期和中期进行的研究显示，与同窝出生的正常野生型小鼠相比，裸鼠的自发肿瘤和化学诱导肿瘤的发生率并没有升高。因此免疫监视理论的研究经历了巨大的挫折，在验证其有效性的试验中失败了。人们不再相信它，并且退出了癌症研究的主要领域20年。

但是这种对免疫监视理论的排斥是不成熟的。几年以后即证实缺乏大量正常T细胞的裸鼠，完整地保留了免疫系统的其他成分，如有些类型的T细胞可以在胸腺（即这些细胞成熟的部位）外发育。另外，一种非常重要的免疫细胞——自然杀伤（NK）细胞，完全是在胸腺外发育成熟的，因而裸鼠体内存在大量NK细胞。

在80年代，研究人员已积累了NK细胞在识别和杀伤包括肿瘤细胞在内的异常细胞中发挥非常重要作用的证据。所以最终从裸鼠的低肿瘤发生率中得到的教训并没有太大的价值，因为裸鼠体内确实仍然持续存在免疫系统重要的功能性成分。裸鼠同其他一些免疫缺陷的小鼠一样，仍然在癌症研究中具有很大的价值（见补充材料38 ◎）。

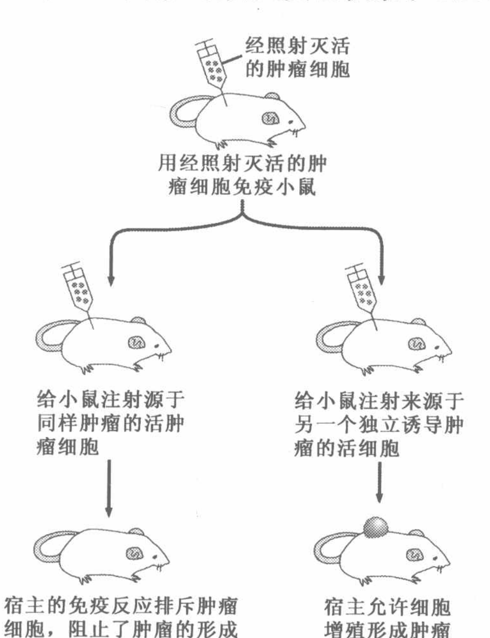


图15.17 用灭活的肿瘤细胞免疫小鼠 首先小鼠被注入经照射灭活的源于一种化学诱导的肿瘤细胞（红色）。随后，当这些小鼠被注入同样活的肿瘤细胞时，瘤细胞不能生长（左下）。然而，当这些小鼠被注入来源于另一种肿瘤的活细胞时（蓝色），瘤细胞增殖并形成肿瘤（右下）。反之亦然，即提前注入灭活的蓝色肿瘤细胞，使小鼠对蓝色的活肿瘤细胞产生了免疫力，而对红色肿瘤没有免疫力。

在小鼠模型中某些化学诱导的肿瘤具有免疫原性，并可被免疫系统识别和清除的证据也被积累。例如，在一批试验中，来自3-甲基胆蒽（3-methylcholanthrene，3MC）诱导的肿瘤细胞，经照射灭活后注射到小鼠体内，照射的目的是阻止细胞在小鼠体内增殖（图15.17）（化学诱导的肿瘤已在同基因宿主的小鼠中生长）。随后小鼠被第二次注射来自相同的活的肿瘤细胞，或者来自第二种由3MC诱导的肿瘤细胞；结果显示注射来自同样肿瘤的活的肿瘤细胞没有生长，而来自另一个由3MC诱导肿瘤的肿瘤细胞则生长并形成一个新的肿瘤。这表明两种肿瘤的抗原性不同。首次接种照射后的死细胞，使小鼠对后来接种的同一肿瘤来源的活细胞具有免疫力。因此肿瘤细胞可能具有不同的抗原，在某些条件下，这些抗原能激活免疫系统使之

攻击并杀伤这些细胞。

15.8 遗传改造小鼠的应用使免疫监视理论复苏

20 世纪 90 年代中期，几个系列的研究对长期处于不受重视的免疫监视理论赋予了新的生机。这些研究得益于最近能按目的制造遗传改造的小鼠品系。应用这项技术（见信息栏 7.10）创造出缺失一个或多个在免疫系统功能方面起重要作用基因的小鼠。

应用 IFN-γ 受体表达缺失小鼠的一组实验，它是通过在生殖细胞中靶向灭活 IFN-γ 受体基因而产生的。IFN-γ 像其他生长因子一样，是一种可以扩散的蛋白因子，它在细胞间传递信号，并通过结合和激活其同源细胞表面受体诱导细胞内的反应。重要的是，目前尚未发现免疫系统外的细胞可以产生 IFN-γ。因此敲除小鼠基因组织中的 IFN-γ 受体基因后的任何变化，都能归因于免疫细胞以及免疫细胞与身体其他细胞相互作用的缺乏。引人注目的是，身体内所有细胞都缺乏 IFN-γ 受体的基因敲除小鼠，对化学致癌物 3-MC 诱导肿瘤的敏感性提高了 10～20 倍。

在另外一个系列的实验中，肿瘤细胞表达功能区缺陷的 IFN-γ 受体，使之对各种免疫细胞释放的 IFN-γ 不能产生反应，把这些细胞注入野生型的小鼠体内后发现这些携带缺陷受体的肿瘤细胞比携带正常受体的肿瘤细胞具有更强的致瘤性。这个特殊的实验提示肿瘤细胞表达的 IFN-γ 受体能使它们对免疫细胞释放的 IFN-γ 起反应，而且这些反应通常可以阻止或延缓由这些细胞形成肿瘤的生长。

IFN-γ 这种令人惊奇的作用至少部分与 NK 细胞的作用有关。NK 细胞的发现和得名源于它们具有将肿瘤细胞视为异常细胞并且可以清除它们的固有能力。一旦 NK 细胞将癌细胞视为杀灭的靶细胞，它们将在靶细胞附近释放 IFN-γ，而这些 IFN-γ 可以引起几种不同的反应。

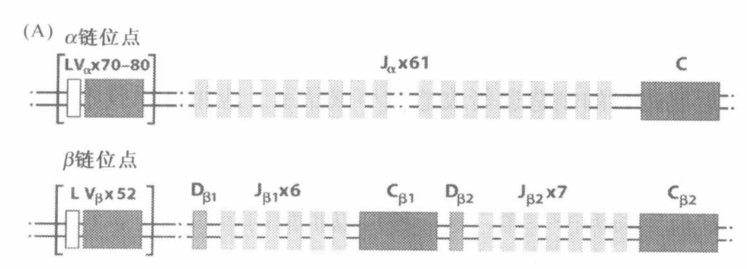
如前所述，IFN-γ 使 NK 细胞可以募集其他类型的免疫细胞帮助靶向杀伤癌细胞，从而增强了免疫系统的反应。在这些免疫应答细胞中，巨噬细胞不仅可以直接杀伤癌细胞，还可以作为专职抗原呈递细胞（APC）加工和呈递来自于这些癌细胞的抗原分子（见图 15.6）。

同时，IFN-γ 可以刺激癌细胞，使其细胞表面 MHC-I 类分子的表达升高，其后者携带的寡肽抗原能进一步激发高度特异性的适应性免疫反应。这有助于解释为什么缺乏 IFN-γ 受体的转化细胞比表达该受体的相应细胞具有更强的致瘤性。所有这些反应似乎在 IFN-γ 受体缺陷的基因改造的小鼠中都是缺乏的，并且观察发现这些小鼠对某些类型自发性肿瘤具有更高的易感性。总之，这些实验为免疫监视在肿瘤形成中，至少在化学致癌物诱发肿瘤的形成过程中发挥重要作用的理论提供了强有力的证据。

免疫监视理论的进一步支持来自穿孔素基因缺乏的小鼠，穿孔素是淋巴细胞和 NK 用于介导杀伤靶细胞的蛋白质。联系到 Tc 细胞利用穿孔素在靶细胞的细胞膜上形成通道，从而使诱导凋亡的粒酶进入靶细胞（图 15.12A）。失去产生穿孔素能力的突变小鼠表现出自发肿瘤的发生率升高，而且暴露于 3-MC 后更易形成肿瘤。

与之类似，缺乏 RAG-1 或 RAG-2 蛋白的遗传改造的小鼠也具有更高的肿瘤易感性。这两种蛋白分子在编码可溶性抗体分子和 T 细胞表面识别抗原的 TCR 基因重排过

程中发挥重要作用（图 15.18）。RAG-1 或 RAG-2 阴性的小鼠缺乏 T 细胞、B 细胞、γδT 细胞（本章没有进一步讨论）和一种 NK 细胞的亚类 NKT 细胞，因此这些小鼠的获得性免疫反应严重缺陷。



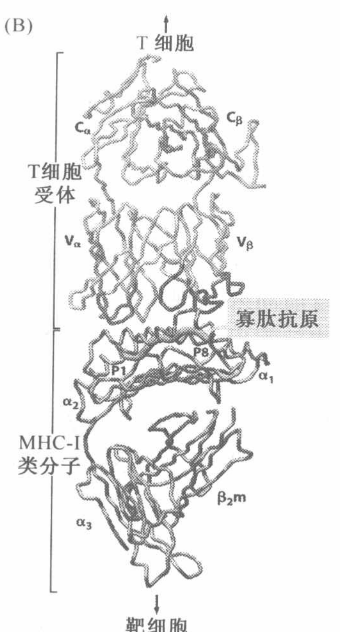


图 15.18 RAG 蛋白和 TCR 基因重排 RAG-1 和 RAG-2 蛋白主要在抗体和 TCR 分子合成过程中负责基因片段的重排。(A) 该图所示即为在胚系细胞中编码 TCR 分子 α 和 β 链的未重排基因的结构。RAG-1 和 RAG-2 蛋白通过去除 α 和 β 基因中的间隔基因片段，随后将原先相距较远的 DNA 片段连接融合，使这两个基因的胚系模板进行了重排。当 RAG 蛋白将编码引导序列（L）具有 70～80 个 V_α基因片段（红）L 片段中的一个 α 链的 N 端段与具有 61 个 J_α 基因片段（黄）之一连接起来时，就实现了 α 链基因的重排；因为选一个 V_α和 J_α基因片段的连接几乎完全是随机的，因此我们就得到了许多不同的 V_α -J_α片段，从而编码众多不同的抗原结合区。同样的基因重排发生在另一条染色体从而导致 TCRβ 链编码基因的形成。既然 TCR 的抗原识别区是由 α 和 β 链编码的氨基酸共同形成的，那么由 RAG-1 和 RAG-2 蛋白介导的编码 TCR 基因的重排能形成众多特异的抗原结合功能区。(B) 借助于细胞表面的 TCR（上），细胞毒性 T 细胞（Tc，CTL）可以识别一种潜在靶细胞表面由 MHC 分子呈递的特异的寡肽抗原（黄色）（下，参见图 15.7B）；TCR 对 MHC 分子-抗原寡肽的识别和结合由 V_α和 V_β区完成（有色环），其形成如图 A 所示（让人困惑的是 TCR 的 V_α功能区由 α 链基因位点中的 V_α基因片段和 J_α基因片段并列连接后编码而成，而 V_β功能区则由 β 链基因位点的 V_β、D_β、J_β基因片段连接后编码而成，如图 A 所示）。一旦 Tc 细胞识别靶细胞，就能杀伤靶细胞（见图 15.12）。由于 T_H和 T_{reg}细胞发挥其他免疫功能也需要通过 TCR 的识别作用，因此 RAG 基因失活导致的 TCR 缺陷，将引起细胞免疫反应多个分支功能障碍，同样由于依赖于 RAG1/2 蛋白介导的抗体基因重排的缺陷也将使体液免疫功能失活。(From C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005.)

例如，在一个试验中，用 3-MC 处理的 52 只 *RAG-2*$^{-/-}$基因缺陷的小鼠中有 30 只发生了肉瘤，而 57 只同样用 3-MC 处理的遗传背景一样的野生型小鼠只有 11 只发生了肉瘤。而且突变小鼠对自发肿瘤的易感性也增加。有 50%较老的 *RAG-2* 基因缺陷的小鼠（18 个月大）发生了胃肠系统的恶性肿瘤，而在同样年龄的野生型小鼠这种恶性肿瘤非常罕见。

支持免疫监视理论在肿瘤预防中重要性的最令人信服的证据，来自对 *RAG2*$^{-/-}$缺陷或野生型小鼠 3-MC 诱发肉瘤的详尽研究。当来源于这两组小鼠的肿瘤细胞被移植入新的 *RAG2*$^{-/-}$缺陷的宿主时，两种来源的肿瘤细胞在新宿主形成肿瘤的效率都很高（图 15.19）。

然而，当肿瘤细胞被移植入同基因的野生型（免疫功能健全的）宿主时，观察到明

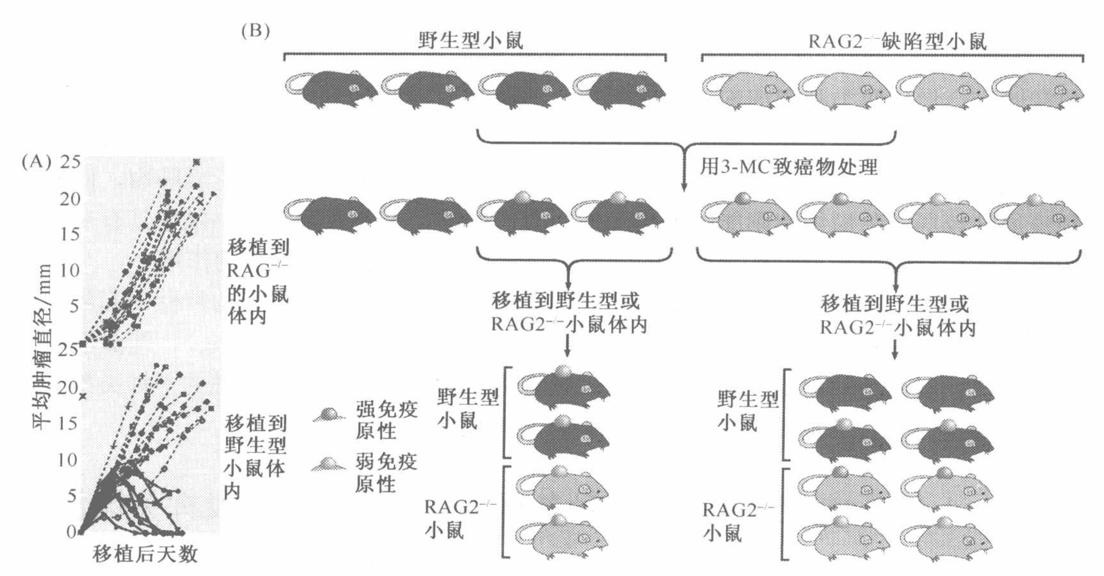


图 15.19　免疫功能在抗肿瘤免疫反应发展中的作用　野生型和 RAG2$^{-/-}$ 免疫缺陷型小鼠同时给予强致癌物 3 甲基胆蒽（3-MC）。（A）当 RAG2$^{-/-}$ 小鼠诱发的肿瘤被移植回 RAG2$^{-/-}$ 小鼠时，接受移植的所有 RAG2$^{-/-}$ 小鼠体内均形成肿瘤（上）。当在 RAG2$^{-/-}$ 小鼠诱发的肿瘤被移植到野生型小鼠体内时，在 20 个接受移植的小鼠中，有 8 个没形成肿瘤（下）。图中每条线代表一只小鼠体内肿瘤的生长曲线。（B）这里总结了本试验和其他在野生型小鼠诱导肿瘤的试验（没有显示）。经 3-MC 处理以后，野生型小鼠形成肿瘤（蓝色）明显少于 RAG2$^{-/-}$ 的突变小鼠（蓝色和红色）。将来自于两组小鼠的肿瘤取出，培育成能在体外增殖的细胞系。将这些细胞系重新接种到野生型小鼠和 RAG2$^{-/-}$ 的突变小鼠体内。来自于野生型小鼠诱发的肿瘤的细胞系（蓝色）在两组小鼠体内均能新的形成肿瘤（左），而来源于 RAG2$^{-/-}$ 的突变小鼠诱发肿瘤的细胞系在 RAG2$^{-/-}$ 的突变小鼠体内也都能形成新的肿瘤（红色，蓝色），但是在野生型小鼠体内只有部分细胞系（蓝色）能形成新的肿瘤（右）。这些试验提示 3-MC 在所有小鼠体内最初都诱发两种类型的肿瘤：免疫原性强的肿瘤（红色）和免疫原性弱的肿瘤（蓝色）。蓝色和红色的细胞系在 RAG2$^{-/-}$ 的突变小鼠体内都能形成肿瘤，但是只有蓝色的肿瘤细胞系能在野生型小鼠体内形成肿瘤，红色的肿瘤细胞系被小鼠有功能的免疫系统清除掉了。这意味着在野生型小鼠诱发的肿瘤是起因于弱免疫原性的肿瘤，因此能在其他野生型小鼠体内形成新的肿瘤。（A，from V. Shankaran，H. Ikeda，A. T. Bruce et al.，Nature 410：1107-1111，2001.）

显不同的结果。预先已在野生型小鼠中诱发的 17 个肿瘤的细胞都成功地在新宿主中生成肿瘤；相反，预先由 3-MC 在 *RAG2*$^{-/-}$ 诱发的 20 个肿瘤细胞中有 8 株细胞不能形成肿瘤，被这些野生型宿主的免疫系统排斥（图 15.19）。

这些发现为我们开辟了肿瘤免疫学的全新领域。说明当 3-MC 转化的细胞在免疫功能正常的宿主体内出现时，那些免疫原性较强的转化细胞（能激发某些类型的免疫反应）能被宿主有效的清除，因此能够生存下来，只有那些弱免疫原性的癌细胞生长。这些细胞在宿主体内增殖并形成肿瘤，随后被接种到同系的其他免疫功能正常的宿主体内也能形成肿瘤。因此这些肿瘤只是在以前的宿主体内最初诱发出的肿瘤的一部分。那些免疫原性较强的肿瘤细胞在肿瘤进展的伊始阶段被宿主的免疫系统杀灭了，失去了形成

肿瘤的机会（图 15.19）。

与之相反，当 3-MC 转化的细胞在免疫功能缺陷的宿主体内出现时（图 15.19），最初同样会形成两类肿瘤细胞，如前所述，即免疫原性强的和免疫原性弱的肿瘤细胞，这两种肿瘤细胞都能在免疫缺陷的宿主体内生存下来。随后，当这两类肿瘤细胞都被移植到免疫功能正常的宿主体内时，那些免疫原性较强的肿瘤细胞不能形成肿瘤，而那些免疫原性较弱的肿瘤细胞则能够形成肿瘤。我们的结论是，在野生型小鼠中具有功能的免疫系统在清除由 3-MC 最初诱发的肿瘤的重要部分起到重大和有效的作用。

观察表明，这些小鼠的免疫系统在确定肿瘤起源和它们表达抗原的特性中起到积极作用。免疫系统对肿瘤表型的积极干预被称为**免疫编辑**（immunoediting），即能消除某些肿瘤，而对其他的耐受。免疫编辑可以被视为是达尔文自然选择学说的一种类型，在这里选择压力来自于免疫系统对新生肿瘤的直接攻击。

15.9 人类免疫系统在防御各种各样的人类肿瘤方面发挥关键作用

由于人类和小鼠的生物学性状存在巨大差异，因此当我们试图通过上述结果来理解人类免疫系统防御肿瘤方面的作用时应该慎重。另外，上述试验中所用化学致癌物在小鼠体内诱发的肿瘤与人类自发肿瘤相比具有更强的抗原性或者说免疫原性（将在第 15.12 节论述）。

尽管如此，20 世纪 90 年代积累的证据清楚地显示人类免疫系统在抵御癌症方面发挥非常重要的作用。这些证据大部分来自对免疫功能有缺陷的人群的观察，结果显示这些个体对某些类型的肿瘤比正常人群更加易感。

实际上，直到最近才发现免疫功能削弱的个体之间也存在很大的差异。那些出生就有免疫功能缺陷的个体早期就夭折了，而那些在生活过程中免疫系统功能逐渐降低的个体，在机体防御感染的能力降低到一定程度也死亡了。然而在过去的几十年，免疫功能低下的个体存活的时间明显延长了，这主要有三个原因。

第一，在整个发达国家，像肾、心脏、肝的移植变得日益普遍（图 15.20A）。因为这些器官几乎总是来自于受者遗传背景不同的捐赠者，受者的免疫系统将移植器官中的供者细胞视为外源性的（异基因型导致组织不相容），并设法清除它们。这种不期望的宿主免疫系统抗移植器官的反应通过长期应用几类免疫抑制剂被控制。

第二，除了这些临床诱导的免疫缺陷，全球范围内有 4000 多万人感染了人免疫缺陷病毒（HIV）；结果，增加了获得性免疫缺陷综合征（AIDS，图 15.20B）的发病率。第三，包括器官移植的受者和许多 HIV 感染者，这些免疫功能低下的人群能长期生存的重要原因，是由于各种各样的抗生素（抗细菌）、抗真菌和抗病毒药物的发展。随着这些免疫低下人群生存期的延长，以前处于潜伏状态的癌前病变也获得了足够的时间发展为临床疾病。

过去的 20 多年里，有数千例器官移植的受者发生了各种各样的实体瘤和造血系统的恶性肿瘤。如前所述（补充材料 28 ◎），在这些肿瘤中，只有极小部分来源于隐藏在供者器官中的转移癌细胞，这些癌细胞在移植过程中未被检测出，一旦被植入受者体内就开始侵袭性生长。通过检测这些肿瘤携带的遗传标记可以分析出这些肿瘤是异体来源

(A)

组织移植	美国2002年移植的病例数
肾	15 680
肝脏	5594
心脏	2231
胰腺	1492
肺	1077
角膜	约40 000
骨髓	15 000

(B)

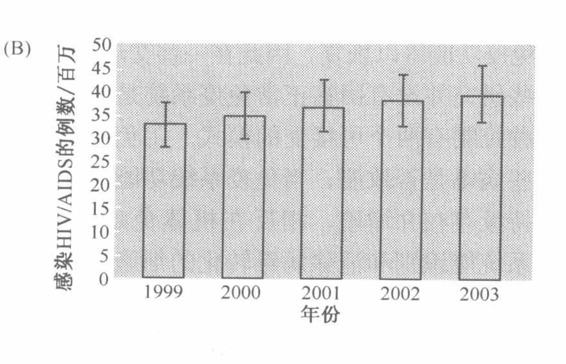


图 15.20　免疫抑制群体　(A) 过去 20 年器官移植的数目增长很快。表中列出了美国 2002 年各类器官移植的数目（到 2003 年中期，自临床开始施行以来，在世界范围内完成超过 66 000 例的心脏移植和 17 000 例的肺移植）。(B) 由于接受同种异体器官移植而使免疫受到抑制的受者数目与感染人类免疫缺陷病毒和处于 AIDS 不同阶段的个体数目相比就相形见绌。（A, From C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005; B, from World Health Organization AIDS epidemic update, 2003.）

的（如器官供者的）。然而，由移植细胞引发的肿瘤，无助于我们回答是否内源性肿瘤（即自身肿瘤）发生率高于免疫健全的患者。

事实上，在免疫功能低下的患者观察到许多自发肿瘤。一个澳大利亚的研究小组对肾移植术后的患者进行了长达 24 年的随访研究。72%的患者至少患上了一种肿瘤。在美国进行的相似研究发现，移植患者发生癌症的风险提高了 3～5 倍。肝移植的患者在移植后 5 年内通常会发生新的肿瘤和产生免疫抑制。俄亥俄州的移植登记处（补充材料 28◎）已经记录了超过 15 000 例发生在移植患者中的恶性肿瘤。

移植患者最常发生的肿瘤是那些由病毒感染引起的肿瘤，其中内皮细胞的成血管细胞前体的恶性肿瘤（由人类单纯疱疹病毒 8 型，即 HHV-8 感染引起）——卡波济氏肉瘤的发生风险升高了 400～500 倍；而包括霍奇金氏病（大部分与 EB 病毒，即 EBV 感染有关）在内的淋巴细胞增殖性疾病的发生风险也提高了 28～49 倍；外阴和肛门部位的鳞状细胞癌（由人类乳头瘤病毒，即 HPV 感染引起）的发生风险升高了 100 倍；肝细胞癌（通常由肝炎病毒 B 和 C，即 HBV 和 HCV）的发生风险升高了 20～38 倍；子宫原位癌（也与 HPV 感染有关）的发生风险提高了 14～16 倍。

在先天性免疫缺陷或者由于 HIV 感染而患上 AIDS 的患者，也观察到相似的病毒诱导恶性肿瘤的高发病率。综上所述，这些发现清楚地表明，在世界范围内有 20%或更高比例的肿瘤直接或间接与上述病毒有关。对于这些肿瘤，免疫系统发挥着重要的防御功能。

在西方国家大约有 90%的人都被强致癌病毒 EBV 感染，然而在这些人群中 EBV 诱导的恶性肿瘤是非常罕见的。这可以解释正常免疫系统在保护我们对抗病毒诱导的恶变是

非常有效的。另外的例子是，多种抑制 HIV 复制药物的联合应用，使得大部分 HIV 感染的患者免疫功能得以恢复，因此在一些艾滋病医院，卡氏肉瘤的发生率降低了 40 倍。

这些研究并没有回答正常免疫系统是如何控制病毒诱导恶性肿瘤的准确机制。我们解释这种控制有两个可接受的模式。①免疫系统发挥着抗各种类型病毒感染的作用，而不管这些病毒是否致癌；当免疫系统功能存在缺陷时，包括致癌病毒在内的许多病毒能在体内持续存在并增殖，相反在机体免疫功能正常时，这些病毒能很快被机体清除；②免疫系统能识别和清除病毒转化的细胞。在免疫功能缺陷的个体，这些细胞也许能长期存活。

上述任一推断或两者综合可以解释在免疫功能低下的个体中病毒诱导肿瘤的高发病率。例如，在艾滋病患者中，高水平的循环 EBV 并不常见。而是经常见到活跃增殖的 EBV 感染的淋巴样细胞明显增加，进而发展为病毒诱导的淋巴瘤。因此，在艾滋病环境中，去除病毒感染的细胞而不是病毒本身好像是有缺陷的（在正常人群中大约有 90%的人感染 EBV，在这些健康携带者的血液中大约有高达 5%对某种 EBV 抗原反应的长寿命的细胞毒性 T 细胞，这表明免疫系统的细胞免疫分支通常投入惊人的部分去控制单一的感染病原体，在这个例子中的 EBV 是通过清除携带活跃增殖病毒的细胞来控制的）。

然而，病毒诱导的恶性肿瘤只占到了临床常规治疗肿瘤的一小部分。这使我们提出，功能正常的免疫系统是否也能激发起针对大多数非病毒起源的人类肿瘤（约 80%）的防御反应。事实上，成人器官移植的受者，与普通人群相比，黑色素瘤的发病率升高了 2～4 倍，而除卡氏肉瘤外，其他肉瘤的发病率升高了 3 倍。接受心脏移植的人群肺癌的发病风险升高了 25 倍。在澳大利亚、新西兰、斯堪的纳维亚登记的移植患者中记载的结肠、肺、膀胱和肾以及内分泌系统肿瘤的发病率都升高了（表 15.1）。试图将这些肿瘤与病毒感染联系起来一直未成功。

表 15.1　处于免疫抑制状态的器官移植患者的肿瘤发病率[a]

发生肿瘤的部位	观察到的病例数	预期病例数[b]	观察与预期例数比值
非黑色素瘤皮肤肿瘤	127	5.1	24.7
甲状腺、其他内分泌腺	30	2.1	14.3
口腔、舌、唇	22	1.6	13.8
宫颈、阴唇、阴道	39	3.6	10.8
非霍奇金淋巴瘤	25	2.4	10.3
肾、输尿管	32	3.5	9.1
膀胱	26	4.7	5.5
结直肠	38	10.5	3.6
肺	30	12.5	2.4
脑	10	4.1	2.4
前列腺	11	5.2	2.1
黑色素瘤	7	4.1	1.7
乳腺	15	13.6	1.1

a Data from S. A Birkeland，H. H. Storm，L. U. Lamm et al.，Int. J. Cancer 60：183-189，1995，as adapted by J. Peto，Nature 411：390-395，2001.

b 表中各癌症病例数为同一时期内同年龄人群中统计。

另外，完全与此不相关的证据也支持免疫系统在帮助我们抵御肿瘤方面的作用。这一证据来自组织病理的发现，在人的肿瘤组织中，经常能看到有许多淋巴细胞的浸润（图 15.21）。这些肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）也许代表了另一类型的基质细胞，它们被肿瘤细胞募集到肿瘤组织中，促进了整体肿瘤的生长，见 13 章。然而另外一种解释也许更有趣，即这些 TIL 也许是免疫系统为了消灭癌细胞而专门部署到这里的。

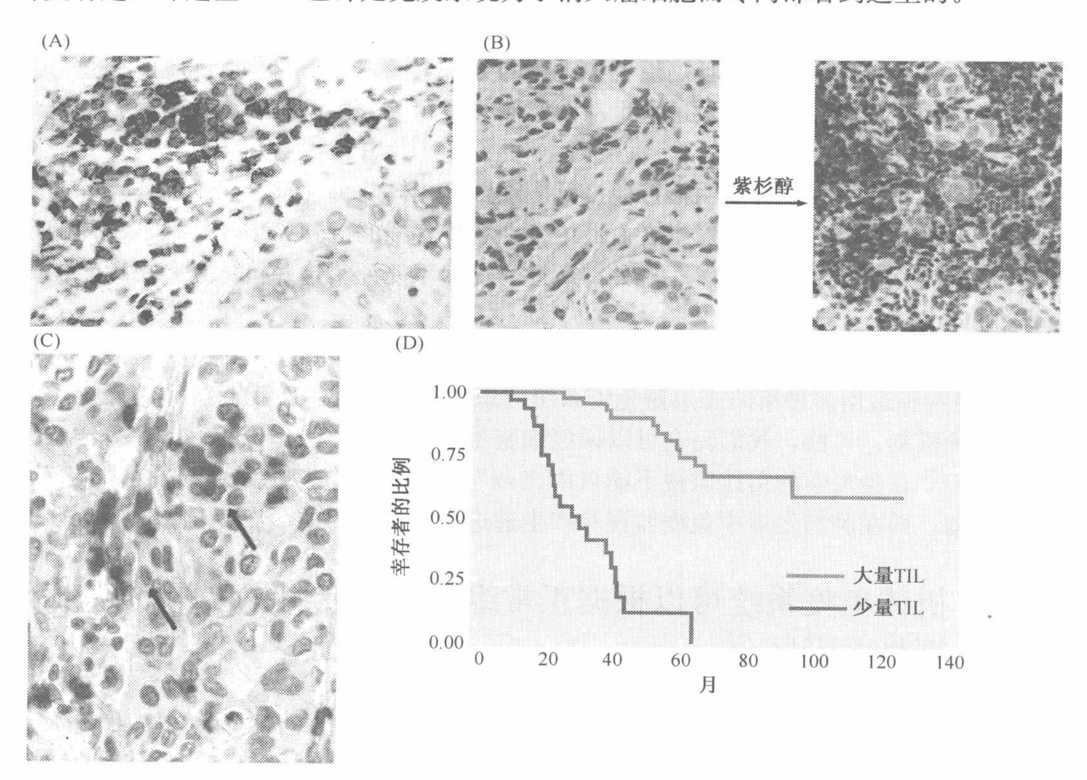


图 15.21　肿瘤浸润淋巴细胞　(A) 口腔癌的免疫染色揭示了肿瘤浸润淋巴细胞（TIL；棕色）在肿瘤的某些区域是很密集的。该检测是用识别 T 细胞表达的 CD3 抗原的抗体进行标记。进一步的研究揭示这些细胞中包含几种 T 细胞的亚群（未显示）。(B) 乳腺癌组织标本用抗 CD3 抗体染色（深紫色），结果表明在未治疗的组织标本中很少有 T 细胞浸润（左），而用化疗药治疗后 T 细胞的浸润大大增加（右）。(C) 在侵袭性非小细胞肺癌组织标本中经常可见 TIL 浸润（NSCLC，箭头所指处）。此处表达 CD8 抗原（深粉色）表明这些细胞主要是细胞毒性淋巴细胞（CTL，Tc）。(D) 卵巢癌患者的临床预后受到他们肿瘤组织中 TIL 浸润多少的影响。从 Kaplan-Meier 生存曲线（纵坐标：确诊后不同月份生存患者的比例，横坐标：生存的月份）可以看出：肿瘤组织内有高水平 TIL 浸润的患者（蓝色曲线）预后明显比肿瘤组织内缺乏 TIL 浸润的患者（红色曲线）好。(A, from T. E. Reichert, L. Strauss, E. M. Wagner et al., Clin. Cancer Res. 8: 3137-3145, 2002; B, from S. Demaria, M. D. Volm, R. L. Shapiro et al., Clin. Cancer Res. 7: 3025-3030, 2001; C, from A. Trojan, M. Urosevic, R. Dummer et al., Lung Cancer 44: 143-147, 2004; D, adapted from L. Zhang, J. R. Conejo-Garcia, D. Katsaros et al., N. Engl. J. Med. 348: 203-213, 2003.)

对一组卵巢癌患者的观察为第二种理论提供了生动的实例。这些证据来自于将这些

卵巢癌患者的临床病程与他们肿瘤组织中存在或缺乏充足数量的肿瘤浸润性淋巴细胞的相关分析。结果表明，在一组经历了外科切除瘤组织，并随后进行化疗的患者中，肿瘤组织有大量 TIL 浸润的患者 5 年生存率为 74%，而癌组织没有大量 TIL 浸润的患者 5 年生存率只有 12%。

对肿瘤组织有大量 TIL 浸润的恶性黑色素瘤患者的观察分析也得出了相似的结论；这些患者确诊后的生存期是瘤组织缺乏大量 TIL 浸润患者的 1.5～3 倍。在乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌和直肠癌患者中进行的分析也证实了浸润淋巴细胞的存在与患者生存之间存在相关性。然而，这些生动的实例只是相关分析，还不能完全说明淋巴细胞是阻止肿瘤进展的重要成分。

而且，这些研究并没有说明体液免疫反应在帮助机体防御各种肿瘤中的作用。实际上，有许多研究结果证实在肿瘤患者血液中存在各种各样的抗肿瘤抗体，这些抗体的存在清楚地表明存在免疫监视。然而，如前所述，仍然不能证实这些抗体是否可以帮助机体清除肿瘤细胞。

总之，大量支持免疫监视理论的证据来自观察报告，有些已被引用（见补充材料 36 ◎），癌细胞运用多种策略来逃避免疫系统的识别和清除，后面我们将详细介绍免疫逃逸的各种机制。目前，我们完全可以说癌细胞尽了最大努力去降低它们的免疫学的禁锢，使它们“在免疫学的雷达监视下能自由飞翔”。而且，这些观察频繁地提供了有说服力的证据，即在肿瘤发展中免疫监视和产生逃逸表现出重要的动态变化。

15.10 机体免疫系统可以根据正常组织和癌变组织之间的微小差别将两者区分

对抗感染病原体的免疫防御的成功依赖于免疫系统能够把它们视为人体内的外来入侵者。这些病原微生物恒定地显示出它们的外来分子的身份，而唤起机体免疫系统固有的和适应性的免疫细胞的攻击。通常这些外源性的分子含有一些可被免疫系统识别的不同于人体自身蛋白库的寡肽序列。

与此同时，功能完好的免疫系统可以对人体自身的蛋白质和氨基酸序列视而不见，这就是在本节后面讨论的免疫耐受。免疫耐受现象使我们更难理解免疫系统是怎样防御自发性肿瘤的产生。最终，针对肿瘤发生的免疫防御的成功实施取决于一个关键因素：人自体组织产生的癌细胞来自于机体本身，免疫系统能够将其识别为外来物吗？

这个问题的答案目前并不清楚。肿瘤细胞表达的大多数蛋白质在结构和表达水平上都是正常的。当然，在各种肿瘤细胞表达的大约 2000 种不同的蛋白质（和它们的异构体）中，仅有一小部分蛋白质在正常组织不表达，而表达于肿瘤细胞。这些结构独特的外源性抗原分子可以诱发机体强烈的免疫应答效应。

Ras 癌蛋白是这种新颖的肿瘤抗原中的一个典型例子，它是正常细胞表达的 4 种亚型的 Ras 蛋白第 12、13 或者 61 位氨基酸残基的部位出现氨基酸置换后产生。这些癌蛋白清晰地展示改变后的化学结构，Ras 癌蛋白中已经改变的氨基酸残基以及与其相邻的氨基酸残基组成的氨基酸序列可能构成诱发免疫应答的寡肽抗原。同样，p53 抑癌基因编码的氨基酸结构因众多基因位点突变而使翻译的蛋白发生改变，成为免疫原性，约

50%人的肿瘤中携带突变的p53蛋白（见补充材料39）。

至今，另一个产生肿瘤特异蛋白的例子来自多种类型的染色体易位导致原来无关联的基因重组编码特定的融合蛋白。这种染色体易位在血液系统恶性肿瘤中最常见，如在慢性髓性白血病（CML）细胞中发现的Bcr-Abl融合蛋白（4.6节）。结构上融合蛋白的大多数氨基酸序列与正常细胞中发现的两种母本蛋白（Bcr和Abl）的氨基酸序列相同，这两种蛋白相连接的小段区域组成了全新的氨基酸序列，能被免疫系统识别为外源物质，因而具有免疫原性。

在肿瘤进展的多步骤过程中，由于人类肿瘤细胞基因组的基因不稳定性（第12章）和肿瘤细胞通过大量的连续性细胞周期，编码结构发生改变的蛋白质的突变等位基因频繁出现在这些基因组中。虽然这些等位基因的绝大多数可能与肿瘤细胞的增殖加速无关，它们只是基因组不稳定性副产物。但是，由这些突变的等位基因编码的蛋白质可能恰好是免疫原性很强的蛋白。这点我们将在后面讨论。

研究较为深入的黑色素瘤清楚地提供了在肿瘤进展中产生的副产物成为抗原的例子。恶性黑色素瘤细胞表达一种突变型的磷酸丙糖异构酶（糖酵解过程中的一种关键酶）。考虑到这种蛋白的正常生理功能，它的突变型结构在肿瘤发病机理中不太可能发挥作用。这种蛋白质在胞内加工过程中产生了一种突变型的寡肽抗原，这种突变型的寡肽抗原可以高于相对应的野生型寡肽5个数量级的亲合力与MHC II类分子相结合。这种结合极大地促进了抗原呈递和黑色素瘤细胞的整体免疫原性。

一般而言，要预测各种不同的蛋白质分子的免疫原性，以及它们诱导机体产生免疫应答的相对能力是有很大难度的。许多具有新颖结构的蛋白质由于它们的整体结构与正常的胞内蛋白相似因而被免疫系统忽略。而其他蛋白质可能引起免疫耐受，因为尽管这些蛋白质的结构与正常的细胞蛋白截然不同，但是由于它们的表达水平非常低以至于不能被免疫系统所察觉。Ras同时说明了这两种情况：在人类许多肿瘤中出现的突变型Ras癌蛋白，它有像正常Ras蛋白一样的几乎正常的三维结构，同时在肿瘤细胞中的表达水平相对较低。此外，某些突变型寡肽由于它们的氨基酸序列的缘故可能无法与患者的MHC分子的抗原展示臂结合（见图15.7）。

免疫系统发育过程中产生免疫耐受的机制尚未完全阐明，使预测蛋白的免疫原性变得更加困难。许多免疫耐受获自胚胎期和出生后早期发育过程中，对机体正常蛋白可以产生免疫反应的B和T淋巴细胞在胸腺和骨髓中被清除掉或者功能失活。随后，全身循环的淋巴细胞对远离胸腺和骨髓的组织中遇到的蛋白产生“外周耐受”。再次说明，机体可能通过清除识别正常组织抗原的淋巴细胞而获得耐受。此外，在15.6节描述的调节性T细胞可通过其他机制抑制已逃避清除的淋巴细胞。

假如发育中的各种淋巴细胞从未接触过某些正常蛋白又会发生什么呢？这些蛋白可能只在胚胎早期发展过程中的特定阶段瞬时表达，但此时免疫耐受却尚未建立。而其他一些蛋白质，像上面已经提及的一样，可能表达水平很低，因此发育期淋巴细胞很少与它们相遇，因而能够识别微弱表达蛋白的淋巴细胞未被清除。此外，某些蛋白可能表达于免疫特赦组织，如脑部，由复杂机制构成的“血-脑屏障”阻断了免疫系统的有效免疫监视。在睾丸也存在类似的有效屏障，从而阻止了免疫系统的常规监控。

总之，一些不同的机制可以阻止机体免疫系统对某些正常的细胞蛋白产生免疫耐受。然而，如果这些蛋白质中的某个蛋白质恰巧在肿瘤细胞中异常高水平表达，那么免疫耐受的这些漏洞可以使免疫系统识别这些肿瘤细胞。例如，端粒酶全酶的催化亚单位hTERT，它在正常细胞的表达水平低于免疫系统可以识别的水平，但是它在85%～90%的人类肿瘤细胞中高水平表达（10.6节）；在日本进行的一项研究表明，在许多肝癌患者体内可以检测到针对hTERT的抗体，并且随着肿瘤的进展这种抗体的滴度逐步提高。目前并不清楚这些抗hTERT抗体是否影响着这些患者的肿瘤进展。

同样，许多乳腺癌细胞表达比正常上皮组织高10～20倍的HER2/Neu受体（图4.6）。因此，HER2/Neu受体蛋白在肿瘤患者体内可以诱导出免疫反应。有些人类黑色素瘤细胞过度表达一类名为神经节苷脂糖蛋白的细胞表面蛋白，它也可以诱导机体的免疫反应。称为GD3的就是这类细胞表面蛋白中的一种，它有时在黑色素瘤细胞中远高于正常黑色素细胞。在这些情形中，过度表达的蛋白或者碳水化合物吸引了正常情况下对其并未觉察的免疫系统的注意。

肿瘤细胞表达一种在正常成人组织从未发现过的胚胎蛋白，这种情况在多种肿瘤中可以见到。当这些胚胎蛋白表达于成人组织时它们可能成为有效的抗原物质。通过另外一种机制——选择性剪接mRNA前体，在结构上不同于正常成人蛋白的模板，其编码蛋白极少与成人的免疫系统接触过。

总之，机体对表达非天然解剖部分（异位）的、发育阶段未能遇到的蛋白，或表达异常高水平蛋白的肿瘤细胞可以发动强烈的免疫攻击。偶尔，打破免疫耐受引起的抗肿瘤反应，实际上对于肿瘤患者适得其反，因为它们引起某些奇怪类型的自身免疫病（补充材料40◎）。

15.11 肿瘤细胞的免疫识别可能迟于肿瘤的进展

在肿瘤进展的多步骤过程中机体的抗肿瘤免疫应答什么时候开始启动呢？有些肿瘤免疫学家认为在肿瘤进展的早期阶段，免疫系统可能无法识别太小的癌巢。因此，他们认为免疫识别可能发生在肿瘤进展过程中较晚的阶段，即当肿瘤逐渐长大并且开始向邻近组织浸润时。

目前并没有确切的证据表明肿瘤细胞的浸润与免疫系统开始识别这些肿瘤细胞之间存在密切的联系。在本书的前面两章中已阐明，肿瘤侵袭的过程包括了募集一些不同类型的免疫细胞共同形成炎症反应，而这种炎症反应与正常的创伤愈合过程也紧密相关。

我们设想创伤愈合实际上包括两种截然不同的生物学过程。首先，受损的组织必须被重建，这个过程包括基质纤维母细胞的活化、上皮细胞的可逆性上皮-间叶细胞的转换（EMT），以及控制血管生成的复杂信号机制（第13章）。其次，创伤愈合的过程必须包括启动免疫防御作用，这样才能使缺乏正常物理屏障的创伤组织免受病原微生物的感染，如细菌和真菌。

在人类进化过程中，某些类型的免疫细胞获得了介导两种生物学功能的能力。因此，巨噬细胞可以释放促进组织重塑的蛋白酶和释放有助于血管生成的因子——这就是组织重建包括的两个方面（13.5节）。此外，巨噬细胞也可以清除损伤组织部位的细胞

碎片（图 15.22A 和 B）。同时，巨噬细胞可以吞噬细菌和真菌；并且，它是一种专职的抗原呈递细胞，它们可以加工和呈递寡肽抗原给 T 辅助细胞。同样，肿瘤相关的巨噬细胞（TAM）可以吞噬（消化）肿瘤细胞或者肿瘤细胞的碎片（图 15.22C）。有研究表明肿瘤内的巨噬细胞消化肿瘤来源的抗原后产生很高水平的在血管生成中发挥关键作用的血管内皮生长因子（VEGF）。

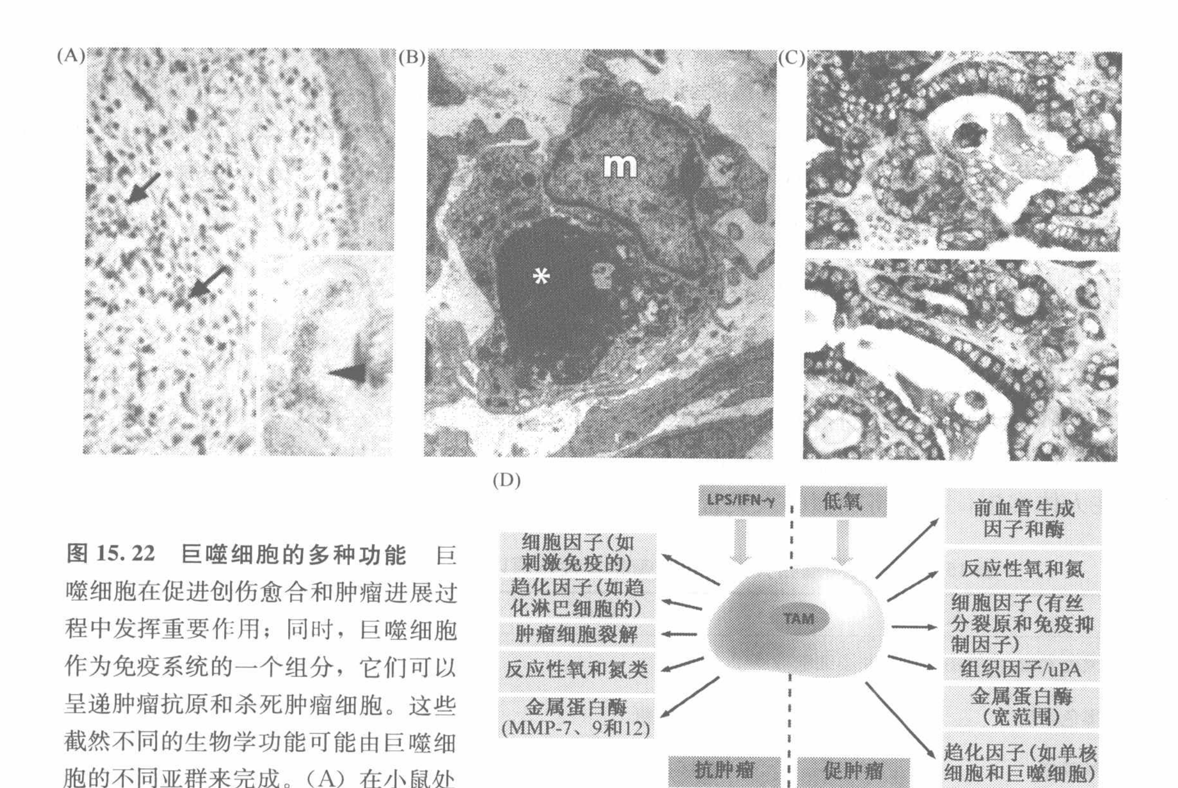


图 15.22 巨噬细胞的多种功能 巨噬细胞在促进创伤愈合和肿瘤进展过程中发挥重要作用；同时，巨噬细胞作为免疫系统的一个组分，它们可以呈递肿瘤抗原和杀死肿瘤细胞。这些截然不同的生物学功能可能由巨噬细胞的不同亚群来完成。(A) 在小鼠处于皮肤损伤愈合过程中的一个部位，采用识别 F4/80 巨噬细胞特异抗原和 c-Fins 受体标志物（内图，箭头头所示）的抗体可以检测到大量（箭头指示）的巨噬细胞（棕色标记）。(B) 透射电镜显示在创伤愈合的中间部位巨噬细胞内有一个被吞噬的凋亡细胞（星号，黑体）。(C) 在甲状腺乳头状癌的导管内腔两个巨噬细胞（粉色，上下图）开始吞噬肿瘤细胞。(D) 巨噬细胞可以通过多种信号转导途径被活化，如干扰素-γ（IFN-g）和可用来作为加强免疫应答的佐剂——细菌的脂多糖（LPS）。一旦被活化，巨噬细胞可将抗原呈递给 T 辅助细胞（T_H），并且启动抗体依赖的细胞介导的细胞毒效应（ADCC）杀伤肿瘤细胞。相反，乏氧以及肿瘤释放的各种生理信号激活的巨噬细胞促进肿瘤的发展（见第 13 章和第 14 章）。(A and B, from P. Martin, D. D'Souza, J. Martin et al., Curr. Biol. 13: 1122-1128, 2003; C, from A. Fiumara, A. Belfiore, G. Russo et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 1615-1620, 1997; D, from L. Bingle, N. J. Brown and C. E. Lewis, J. Pathol. 196: 254-265, 2002.)

这种单个细胞类型（或者一群紧密相关的细胞）具有多种功能的现象提示肿瘤的侵袭、炎症、血管生成和免疫应答是紧密相关的过程。这种紧密关系也许可以有一种解剖学的解释：只要癌变的上皮细胞仍然处于自己基底膜一侧，它们很大程度上屏蔽了在这

个膜的另一侧基质区不断巡逻的免疫细胞。然而一旦肿瘤细胞突破基底膜，浸润的肿瘤细胞就可能被免疫细胞识别。它们最初被自然杀伤细胞识别，随后自然杀伤细胞可能发出警告信号引发由巨噬细胞和参与适应性性免疫应答的淋巴细胞介导的第二轮攻击。

尽管以上推测有可能是正确的，但是仍有待实验证实。此外，有迹象表明在上皮细胞具备侵袭性和突破基底膜前就已经存在某种程度的免疫监视。例如，有证据表明在一些上皮组织（如肠道上皮）存在上皮内淋巴细胞（IEL）；这些免疫细胞负责监视上皮细胞是否存在侵袭的病原微生物。这些上皮内淋巴细胞也可能作为预警哨兵，使免疫系统在癌变细胞具有侵袭性以前检测到肿瘤细胞。此外，如图 15.22C 所示，巨噬细胞可以吞噬位于基底膜上皮细胞一侧的肿瘤细胞（该病例中是在腺癌形成的管腔内）。目前并不清楚这些吞噬了肿瘤细胞的巨噬细胞是否能迁移至淋巴结然后将肿瘤细胞相关抗原呈递给 T 辅助细胞，从而启动获得性体液和细胞免疫应答。

15.12 肿瘤特异性移植抗原可以诱导有效的免疫应答

假如肿瘤细胞可以诱导出获得性免疫应答反应，那么这种应答反应肯定可以追溯到某种肿瘤细胞特异性的抗原，肿瘤免疫学家将这些抗原蛋白分为两大类：肿瘤特异性移植抗原（TSTA）和肿瘤相关移植抗原（TATA；表 15.2）（由于肿瘤移植实验不可能在人体实施，因此将类似的人类蛋白命名为 TSA 和 TAA）。

表 15.2 一些肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原以及人 T 淋巴细胞识别的抗原肽

人类肿瘤	蛋白	抗原肽
黑色素瘤、食管癌、肝癌、非小细胞肺癌	MAGE	EADPTGHSY，SAYGEPRKL
黑色素瘤	酪氨酸酶	MLLAVLYCL，YMNGTMSQV
结肠癌	癌胚抗原(CEA)	YLSGANLNL
乳腺和卵巢癌	HER2/Neu	KIFGSLAFL
头颈癌	Caspase8	FPSDWCYF
慢性髓性白血病(CML)	Bcr-Abl	ATGFKQSSKALQRPVAS
前列腺癌	前列腺特异性抗原(PSA)	FLTPKKKLQCV，VISNDVCAQV

引自 R. A. Goldsby et al，immunology，5th ed . New York：Freeman，2002；and B. J. Van den Eynde and P. van der Bruggen，Curr. Opin. Immunol. 9：684-693. 1997.

肿瘤特异性移植抗原指的是这种抗原物质只在某种肿瘤或者某一类肿瘤表达，而不在人体正常组织表达的蛋白或者寡肽。肿瘤特异性移植抗原可以由病毒基因组或者在肿瘤进展过程中出现的突变体细胞的等位基因（如突变的 *ras*、*p53* 或者 *bcr-abl* 基因）编码。由于肿瘤特异性移植抗原结构异常，它们不太可能在免疫系统的正常发育阶段过程中诱导免疫耐受。

相反，肿瘤相关移植抗原不仅仅与肿瘤细胞相关，它们既存在于肿瘤组织或细胞，也存在于正常组织或细胞。肿瘤相关移植抗原包括一大类因各种原因而未诱导出完全免

疫耐受的正常蛋白，当它们在肿瘤细胞表达时，就会吸引免疫系统的注意力。TATA是一种正常的细胞蛋白的论据来自于许多特异类型肿瘤所显示的某种 TATA 的观察资料，如黑色素瘤的一组 TATA。

就像它们的名字暗示的一样，这两种类型抗原的存在可以通过肿瘤移植实验来证实。例如，回顾一下在前面已经提及的一个例子（见图 15.17），化学致癌物 3-甲基胆蒽可诱导近交系小鼠产生肉瘤，而这些肉瘤细胞可以移植给另外一只同系小鼠。随后这些肿瘤细胞在老鼠体内增殖几周后经手术切除。如果将这些肉瘤细胞植回原来经过手术切除肿瘤后的小鼠，会产生肿瘤的特异性排斥反应。然而，如果把来源于另一个 3-甲基胆蒽诱导的肉瘤细胞移植给这只老鼠，则可出现肿瘤。

以上现象表明 3-甲基胆蒽诱导出的两种肉瘤抗原性存在差别，第一种肉瘤细胞携带有一种或者多种特异的抗原决定基，这些抗原决定基可以诱导老鼠产生排斥再次移植的相同肉瘤细胞的免疫反应。这提示最初诱导产生这些肿瘤的致突变性致癌物（3-甲基胆蒽）使肿瘤细胞发生一种或者多种细胞内的基因突变，而这些突变基因的产物具有肿瘤特异性移植抗原的功能。此外，以上现象似乎提示 3-甲基胆蒽每次诱发的肿瘤就产生了一种或一类新的肿瘤特异性移植抗原（图 15.23）。

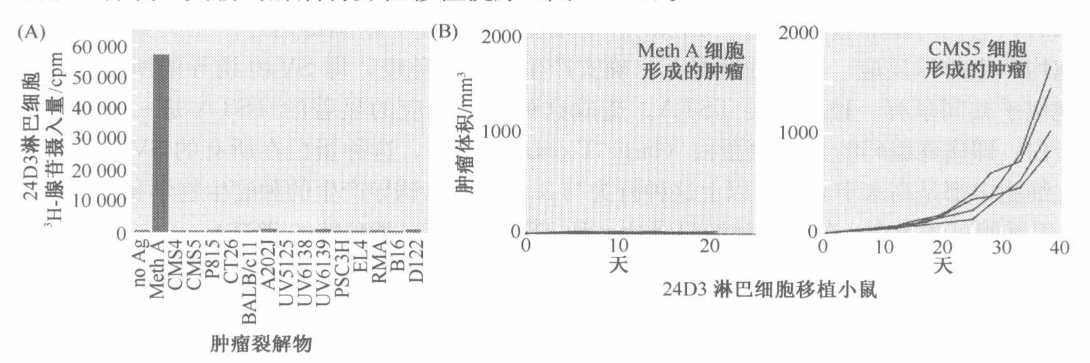


图 15.23 化学诱导的纤维肉瘤具有抗原特异性 将 3-甲基胆蒽诱导产生的 Meth A 纤维肉瘤细胞系的细胞裂解物免疫 BALB/c 小鼠。从这些小鼠产生的抗原触发的淋巴细胞系，称为 24D3。（A）采用³H-腺苷掺入实验可以检测到 24D3 淋巴细胞在 Meth A 细胞溶解物刺激下的增殖（第二道）。但是，24D3 淋巴细胞在其他 14 种肿瘤细胞系的裂解物刺激下，包括甲基胆蒽诱导的其他肉瘤，UV 诱导产生的皮肤鳞状细胞癌、淋巴瘤、黑色素瘤和肺癌，不发生增殖（剩余道）。在没有任何抗原刺激下，24D3 淋巴细胞也不出现增殖（第一道）。（B）将 24D3 淋巴细胞的一个克隆群体移植给 BALB/c 宿主小鼠后，这些小鼠对随后接种的 Meth A 纤维肉瘤细胞产生特异排斥反应（左图 l）。但是接种另外一种不相关的纤维肉瘤细胞系 CMS5，那么 24D3 淋巴细胞不会阻止肿瘤的形成（右图）。（From T. Matsutake and P. K. Srivastava, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：3992-3997，2001.）

通过实验检测和鉴定肿瘤特异性移植抗原具有很大难度。假设 3-甲基胆蒽诱导产生的每种肉瘤都表达一种强抗原性的肿瘤特异性移植抗原。因此荷瘤小鼠的免疫系统会针对这种肿瘤特异性移植抗原产生激烈的免疫反应，试图清除肉瘤中高表达这种肿瘤特异性移植抗原的肿瘤细胞，但是却无法清除低表达这种抗原的肿瘤细胞。根据达尔文的自然选择规律，实验者研究的是那些可以长期生存低表达肿瘤特异性移植抗原的肿瘤细

胞和子代肿瘤细胞，这就使通过生化的方法分离和鉴定肿瘤特异性移植抗原蛋白变得更加困难。

近年来，采用基因克隆技术已经克隆出一些编码 3-甲基胆蒽诱导产生的肿瘤特异性移植抗原的基因。克隆策略之一是将作为免疫识别靶点的与 3-甲基胆蒽转化细胞表面 MHCI 类分子结合的寡肽洗脱、纯化、测定氨基酸序列。通过测出的氨基酸序列预测相应的编码基因的核苷酸序列，最后克隆出编码基因。通过分析从这些肿瘤细胞克隆出的肿瘤特异性移植抗原的基因编码序列，发现这些基因是从编码各种细胞蛋白的正常基因发生等位基因的点突变而来，而这些正常蛋白并未涉及细胞恶变的任何路径（补充材料 41 ◎）。

这些观察结果表明在致点突变的化学致癌物 3-甲基胆蒽（12.6 节）致癌过程中，靶细胞的原癌基因（通常是 K-*ras* 基因）和其他一些基因，如突变后编码肿瘤特异性移植抗原的等位基因，都发生突变；后者作为无辜的旁观者被攻击，它与致瘤过程无因果关系，但是在大量诱癌剂诱导肿瘤形成中已经破坏了它们。

更加重要的是，这些化学诱导产生的 TSTA 与肿瘤病毒感染诱导产生的 TSTA 的生物学行为差异显著。例如，SV40 病毒可以诱导小鼠产生肉瘤。将这些小鼠的肉瘤切除后，它们对随后移植的这些切除的肿瘤细胞或者由 SV40 病毒诱导产生的其他肿瘤细胞均产生排斥反应。在这种情况下，确实产生了交叉免疫，即 SV40 诱导的所有肿瘤细胞似乎共同享有一种或一类 TSTA。造成这种交叉反应的显著的 TSTA 是一种熟悉的蛋白：即病毒编码的大 T 癌蛋白（large T oncoprotein），这种蛋白在所有的 SV40 病毒转化细胞中都是高水平表达。以上这种行为与 3-甲基胆蒽诱导产生的肿瘤生物学相反，因为 3-甲基胆蒽诱导产生的每种肿瘤只表达一种 TSTA 或者一类独特的 TSTA。

这些现象提出一个问题：在人类肿瘤发生过程中是否也存在类似的机制呢？因此，是否癌细胞高度不稳定的基因组（第 12 章）产生突变抗原蛋白是肿瘤发展突变过程伴随的副产品（见信息栏 15.1）？或者，3-甲基胆蒽诱导产生的 TSTA 是否由于在许多小鼠致瘤实验中人为的使用高剂量致癌物的结果，并不能准确反映人类肿瘤形成中的突变过程呢？

信息栏 15.1　微卫星不稳定性经常引发免疫原性更强的肿瘤　在 12.4 节中已经提及，DNA 错配修复的作用机制缺陷可以导致微卫星不稳定性（MIN），它可以使肿瘤细胞基因组的数百甚至数千个细胞基因突变。在其他的结果中，这些突变可以导致基因的可读框发生移位。这些突变的等位基因可以编码新的氨基酸序列，有时被称为“移码肽”（frameshift peptides），其中一些可能具有肿瘤特异性抗原的作用。

据这种逻辑预测，具有微卫星不稳定性的 15%的人类结直肠癌与宿主免疫系统相互作用应该不同于没有 MIN，而具有染色体不稳定性（CIN）的多数结直肠癌患者。事实上，具有 MIN 的肿瘤内有较多的肿瘤浸润性淋巴细胞和较低转移率。此外，具有微卫星不稳定性的与染色体不稳定性的结直肠肿瘤相比，缺乏 MHC I 类蛋白抗原呈递更为常见（60% vs. 30%），这提示具有 MIN 的肿瘤在巨大压力下为逃避免疫系统各方面的杀伤，采取封闭它们细胞表面 MHC I 类蛋白的抗原呈递的免疫逃逸方式。总之，这些现象表明 MIN 在高免疫原性的结直肠癌中，能使一些肿瘤更快的发展。

15.13 肿瘤相关移植抗原也能诱导抗肿瘤免疫

前面已经提及，肿瘤相关移植抗原（TATA）是由于各种原因没有诱导出机体免疫耐受的正常细胞蛋白。当这些正常蛋白在肿瘤细胞中表达时，它们诱导出可以检测到的免疫反应，包括体液和细胞免疫应答。

由于种种原因，黑色素瘤的抗原性相比人类的其他所有肿瘤的抗原性研究得更加深入（补充材料 42 ◎）。许多抗原性来自它们显示的某些 TATA。黑色素瘤细胞可能过度表达源自正常的黑色素细胞的前体细胞低水平表达的某些蛋白，这些系列特异性的蛋白有时称为分化抗原，暗示这些蛋白是肿瘤的正常前体细胞控制分化过程的残迹。其中黑色素瘤的肿瘤相关抗原属于分化抗原包括转铁蛋白、酪氨酸酶（图 15.24A）gpl00、Melan-A/MART-1 和 gp75。

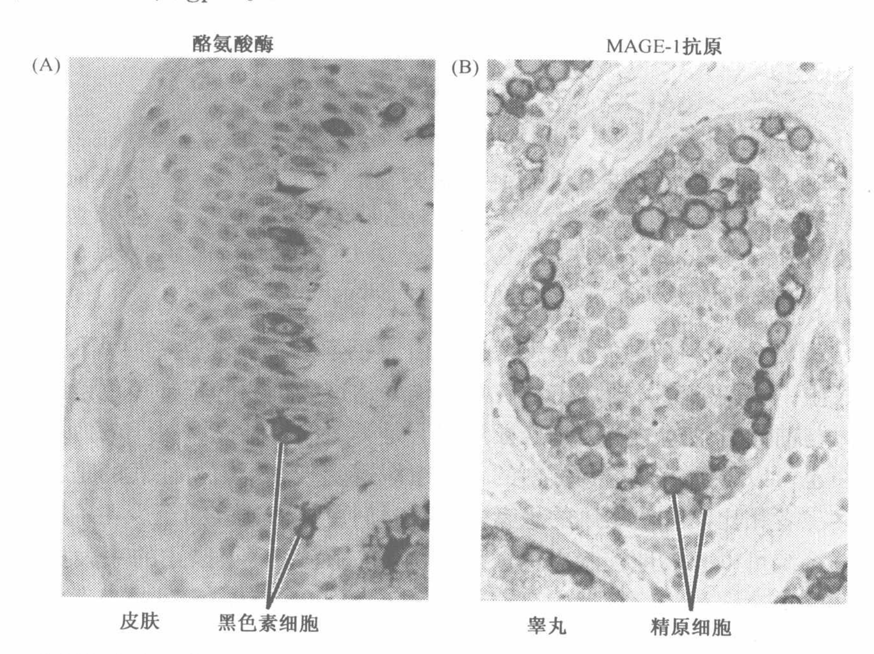


图 15.24 在黑色素瘤细胞上显示的正常蛋白作为肿瘤相关抗原 （A）使用单克隆抗体在皮肤的黑色素细胞中可检测到酪氨酸酶（红色，位于皮肤基底膜的上方），它是一种与黑色素细胞和黑色素瘤细胞色素产生相关的一种酶。在其他正常组织中不能检测到酪氨酸酶。它由黑色素瘤细胞表达，可使它们变为免疫原性的和细胞毒性淋巴细胞杀伤的靶子。（B）这里，睾丸中的精原细胞已被抗 MAGE-1 抗原的单克隆抗体染色；正常情况下，这种抗原仅见于胎盘中。在多种人类肿瘤中已经检测到它的表达，并且在黑色素瘤中被详细的研究，因为当这些肿瘤表达它时通常具有免疫原性。（A，from Y. T. Chen，E. Stockert，S. Tsang et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92：8125-8129，1995；B，from J. C. Cheville and P. C. Roche，Mod. Pathol. 12：974-978，1999.）

黑色素瘤细胞表达的这些分化抗原可以诱导机体免疫系统产生很强的免疫应答反应，从而导致机体出现一种非常特殊的自身免疫疾病——白癜风，即在一些黑色素瘤患者中出现大面积的皮肤褪色（图 15.25）。这种褪色是机体针对黑色素瘤的一种特异性

免疫应答产生的临床表现。例如，当采用能提高肿瘤患者抗肿瘤免疫应答的 IL-2 治疗 104 个肾癌患者时，无一发生白癜风；相反，当 74 个黑色素瘤患者接受相同的治疗后，有 11 名患者出现了白癜风。

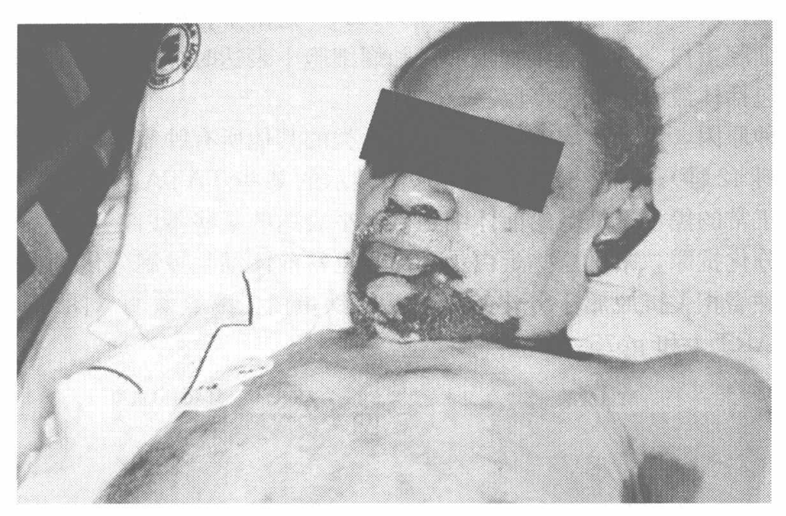


图 15.25 黑色素瘤诱发的自身免疫性色素脱失 图中显示，在黑色素瘤产生前是黑色皮肤的患者，由于黑色素瘤细胞诱导产生的自身免疫攻击导致患者除了一些孤立区域（面部、腋窝）外，其他部位的皮肤出现色素脱失。失去色素的现象称为白癜风，它与黑色素瘤患者的生存期延长相关。(Courtesy of A. N. Houghton.)

目前已清楚，在这些黑色素瘤患者中，由黑色素瘤细胞表达的 TATA 诱发的免疫应答可以产生一种副反应，即攻击和破坏同样表达这些抗原的正常黑色素细胞。这种类型的白癜风与前面讨论过的副癌综合征形式上是类似的（补充材料 40），即肿瘤细胞表达的蛋白也可以导致表达这些蛋白的正常组织遭受破坏。值得注意的是，伴有白癜风的黑色素瘤患者相比没有白癜风的患者的生存时间更长，这表明至少在一段时间内这些患者的免疫系统可以有效地控制黑色素瘤（例如，在 1987 年描述的一大批黑色素瘤患者中，75%的患者在最初确诊后生存期超过 5 年。而在伴有白癜风的患者中，86%的患者生存期超过 5 年）。

人类黑色素细胞的免疫原性也可以源自它们表达的另外一大类的 TATA，即癌胚抗原。顾名思义，癌胚抗原指的是在胚胎形成过程中表达，并被肿瘤组织再次表达的一类抗原。这类抗原包括名为癌-胚胎或者癌-睾丸（CT）抗原，它们在睾丸和胎儿卵巢正常表达。编码这些抗原的基因，如编码 MAGE-1（图 15.24B）、MAGE-3、BAGE、GAGE-1 和 GAGE-2 的基因已经被克隆（补充材料 43）。到 2003 年为止，已经鉴定出编码 89 种不同的癌-睾抗原的 44 个基因或者基因家族。

另外，男性患者缺乏针对这些抗原的免疫应答反应，有可能是因为在睾丸中有些类型的细胞不表达 MHCI 类分子因而无法将这些抗原有效的呈递（当然在女性的任何组织中都不会表达这些蛋白）。此外，睾丸中的有些细胞表达较高水平的 Fas 死亡受体的配体 FasL（9.14 节），从而可以使这些细胞安全远离巡视的 T 淋巴细胞和其他免疫细胞，进一步保证了表达在这些睾丸细胞的蛋白在免疫特赦区是免疫耐受的，而不诱发免

疫应答反应。这也许可以解释为什么这些生殖细胞蛋白在体内异位表达时通常会诱导出强烈的免疫应答反应。

体内这些黑色素瘤蛋白诱导的免疫耐受很容易被克服（免疫学家称之为打破）使科学家想到了一种简单有效的抗肿瘤治疗策略，即将这些抗原视为病毒或者细菌等外源微生物的侵袭产物。这种理念已使科学家尝试应用由一种或不同种的这些抗原蛋白组成的疫苗免疫小鼠或人。

例如，一些黑色素瘤细胞过度表达正常转铁蛋白的百余种受体之一。这种蛋白涉及全身很多类型细胞中铁的吸收和代谢。向小鼠注射纯化的鼠转铁蛋白受体后可以诱导小鼠产生针对这种蛋白的免疫反应。这提示通过暴露高水平的这种蛋白，很容易打破小鼠体内针对这种蛋白的任何免疫耐受。这些免疫过的小鼠可以排斥随后移植的任何高表达鼠转铁蛋白受体的黑色素瘤。为了使肿瘤患者产生有效抗肿瘤免疫，肿瘤学家提出了一种更加普遍的动员免疫系统攻击人类肿瘤的策略。我们将在这章的后面予以讨论。

15.14 肿瘤细胞通过抑制肿瘤抗原在细胞表面的表达逃避免疫监视

此前描述的免疫功能可能提示，试图通过免疫系统建立防御已长出的许多肿瘤是相当罕见的，主要因为耐受使免疫系统对于多种类型癌细胞表达的抗原视而不见。事实上，在肿瘤患者的血液中可以检测到结合在肿瘤细胞表面抗原上的较高滴度（浓度）的抗体；甚至可能出现在大多数肿瘤患者中。此外，在许多肿瘤患者的血液、淋巴结和肿瘤组织中，可以检测到能识别肿瘤相关移植抗原（TATA）的辅助性 T 淋巴细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞。

这些观察表明，尽管机体存在免疫耐受，但人类的免疫系统针对许多类型（也许是所有类型）的肿瘤细胞成功地进行攻击。在免疫缺陷的个体中，肿瘤发病率提高，这也表明免疫系统发起的某些攻击可以阻碍肿瘤的发展（15.9 节）。

尽管这样，许多肿瘤的进展仍然无法被免疫防御机制有效地阻断，而这种免疫防御机制用某些标准来衡量的话是格外有效的。例如，免疫学家发现在一个肿瘤细胞表面只要有 10 个源自 TATA 或者 TSTA 的寡肽（与 MHC I 类分子结合）就足以吸引表达适合识别抗原的 T 细胞受体的细胞毒性 T 淋巴细胞，进而杀死这些肿瘤细胞。

为什么人类免疫系统通过这些有效的淋巴细胞和其他免疫攻击手段，在阻断肿瘤进展方面屡战屡败呢？最有可能的解释可以从前面已经描述过的（15.8 节）基因改变小鼠的行为得到启示：有些肿瘤免疫原性非常强，它们可以被正常的免疫系统有效的清除。尽管在人体中可以检测到这类肿瘤，但它们还是很少见。其他的肿瘤免疫原性很差，因为它们表达的是已经引起了免疫耐受的一些蛋白；这类肿瘤生长旺盛，很快在临床上显现。

另外一种可能就是某些具有免疫原性的肿瘤最初可能遭受免疫系统的强烈攻击，但是后来寻找到逃避清除的不同途径——免疫逃逸的策略（表 15.3）。这些肿瘤细胞随后可以旺盛生长，它们的子代细胞可以形成体积更大、威胁患者生命的肿瘤。后面这种解释很好地描述了许多人类肿瘤的生长过程，从观察到的人类肿瘤细胞不断发生改变可以得到启示，因为唯一可以解释出现这种改变的理由就是肿瘤细胞通过这些改变来逃避免

疫系统的攻击。

表 15.3　肿瘤细胞采用的免疫逃逸机制

策略	机制	逃避的对象
隐藏身份	抑制肿瘤抗原（TSTA 或 TATA）的表达，下调 MHCI 类蛋白表达	细胞毒性 T 淋巴细胞
隐藏压制	抑制 NKG2D 配体（如 MICA）	NK 细胞
失活免疫细胞	破坏免疫细胞的受体	NK 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞
	通过腺苷、MICA 饱和免疫细胞受体	NK 细胞、各种免疫细胞
避免凋亡	通过增加 IAP 抑制 caspase 级联反应；获得对 FasL 介导的细胞凋亡的抵抗	
诱导免疫细胞凋亡	释放可溶性的 FasL	细胞毒性 T 淋巴细胞
	释放细胞因子（IL-10、TGF-β）	细胞毒性 T 淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞
中和细胞内毒素	通过酶作用解毒 H_2O_2，前列腺素 E_2	巨噬细胞、NK 细胞
中和补体	过度表达 mCRP	补体系统

最常见的免疫逃逸策略是肿瘤细胞可采用停止表达被免疫系统和它的细胞毒性淋巴细胞吸引和注意的肿瘤相关移植抗原（TATA）或者肿瘤特异性移植抗原（TSTA）。重要的是，大部分这些抗原并不是参与细胞恶性转化过程中的一些分子，它们仅代表组织特异性分化抗原，通常典型地表达在产生肿瘤的那种组织上（见图 15.24）。肿瘤细胞可以抑制这些抗原的表达而不付出任何代价，即这些肿瘤细胞的生存期和增殖能力不受任何影响。事实上，肿瘤细胞群体经常通过启动子甲基化（7.8 节）抑制编码抗原基因的表达，隐藏它们中间的突变成分。因此，这些抗原表达缺失的细胞可以逃避针对绝大部分肿瘤细胞的免疫攻击，它们的子代细胞最终可以成为肿瘤细胞群体中的主要细胞。

一个具有说服力的例子，对一位黑色素瘤患者采用酪氨酸酶蛋白进行免疫，以诱导出针对这种蛋白的免疫反应。这名患者的黑色素瘤细胞也表达这种酪氨酸酶蛋白（酪氨酸酶参与黑色素细胞的色素合成而不参与细胞恶性转化；见图 15.24A）。最初，诱导出的免疫反应可以抑制黑色素瘤细胞的转移。但是很快在转移的黑色素细胞中出现了一些酪氨酸酶表达缺失的肿瘤细胞。当表达酪氨酸酶的细胞持续被抑制时，这些酪氨酸酶表达缺失的肿瘤细胞快速增殖，最终导致患者死亡。这就是被免疫学家称为“免疫逃逸”的现象。然而，在另外一例黑色素瘤患者中，这种类型的免疫逃逸并未使肿瘤细胞免受免疫系统的攻击而提供了长期保护（信息栏 15.2）。

信息栏 15.2　免疫逃逸可以暂时延缓肿瘤细胞遭受免受免疫攻击　一位黑色素患者的原发病灶手术切除 5 年后，在患者的淋巴结出现多处转移灶，随后将这些转移灶也手术切除（图 15.26）。在这个病例中，肿瘤浸润性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）识别目前研究较为深入的公认的黑色素瘤相关的肿瘤抗原 MART-1。这位患者在随后的 6 年内没出现任何临床表现。6 年后在该患者的区域淋巴结出现黑色素瘤复发，这个病灶也被手术切除。现在，肿瘤细胞由 MHC I 类分子介导的 MART-1 寡肽呈递缺失，肿瘤组织中能够识别 MART-1 的特异性 CTL 也缺失（尽管肿瘤细胞仍然继续合成 MART-1）。取而代之的是肿瘤相关的 CTL 识别另外一种黑色素瘤相关抗原酪氨酸酶，这种抗原由肿瘤细胞的 MHC I 类分子加工呈递。

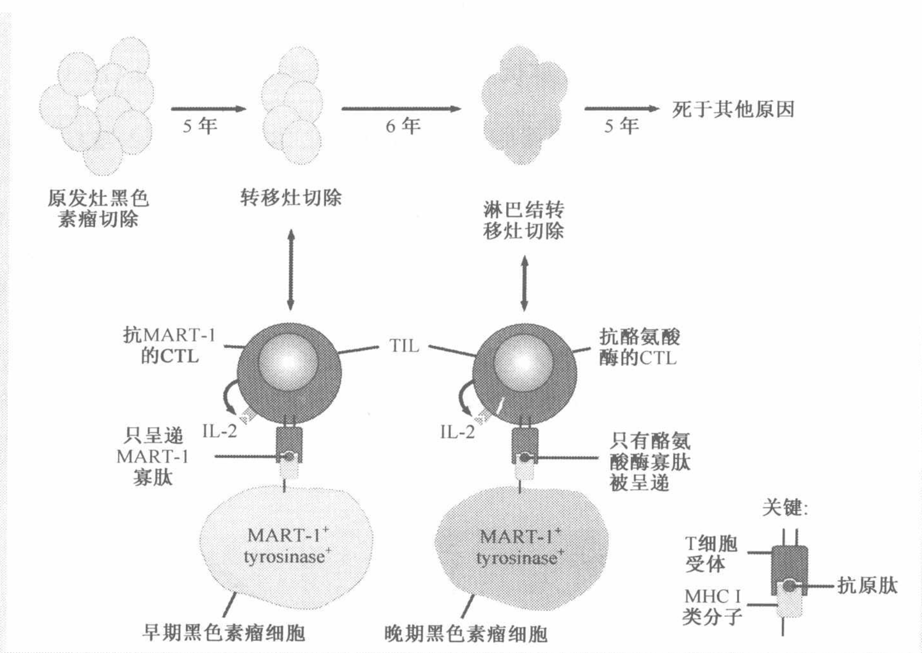


图 15.26 免疫系统动态适应肿瘤细胞不断变化的抗原呈递 首先切除原发的黑色素瘤，5 年后切除出现的转移灶，肿瘤细胞 MHC I类分子仅呈递 MART-1 寡肽抗原（红点），尽管这些肿瘤细胞同时合成 MART-1 和酪氨酸酶蛋白；此时，肿瘤浸润性细胞毒性淋巴细胞（CTL）通过它们的 T 细胞受体识别 MART-1 抗原。6 年后，患者再次出现一处淋巴结转移灶并被手术切除，此时虽然肿瘤细胞仍然同时合成 MART-1 和酪氨酸酶蛋白，但是肿瘤细胞的 MHC I类分子仅呈递酪氨酸酶寡肽抗原（蓝点）而肿瘤浸润性 CTL 也仅仅识别酪氨酸酶抗原。因此，免疫系统可以与肿瘤细胞同时进化，为了抗击黑色素瘤细胞的需要产生具有新的特异性的 CTL。

以上现象表明肿瘤患者的免疫系统通过攻击另外一种肿瘤相关抗原（酪氨酸酶）来适应黑色素瘤细胞的最初免疫逃逸策略（抑制 MART-1 的抗原呈递）。尽管这样，到患者进行第三次手术时，患者的黑色素瘤细胞开始下调所有的 MHC I 类分子的表达。这种 MHC I 类分子的表达缺失最终应该可以使在第三次手术后散布的肿瘤细胞逃避所有的 CTL 的攻击并最终发展成威胁患者生命的转移病灶。尽管这样，这名患者又生存了 5 年并且最终的死因与黑色素瘤无关。该患者在患有这种高度侵袭性恶性肿瘤的情况下能够继续存活 5 年提示该患者的免疫系统能够采用目前我们尚未明确的机制对残存的黑色素细胞进行免疫监视。其中很有可能的一种机制就是能够攻击 MHC I 类分子表达下调的靶细胞的自然杀伤细胞（后面章节讨论）在该患者生命中最后 5 年无症状生存中发挥关键作用。

在许多肿瘤中，肿瘤细胞并不仅仅采取抑制肿瘤抗原这一条策略，因为对于肿瘤细胞的持续性恶性增殖而言，TSTA 或者 TATA 的表达是必需的。例如，肿瘤细胞过度表达的正常 HER2/Neu 蛋白（将近 30%乳腺癌细胞表面表达的一种生长因子受体）可以诱导有效的免疫反应。然而，乳腺癌肿瘤细胞不能停止这种蛋白的表达，因为这种蛋白的持续性高表达对于肿瘤细胞的增殖和抑制凋亡至关重要。

因此，在某些因为 TATA 或 TSTA 的表达对于肿瘤细胞的恶性生长至关重要而不能下调其表达的肿瘤中，它们需要采取其他策略来逃避免疫系统的攻击。其中一个重要而且被肿瘤细胞普遍采用的免疫逃逸机制就是通过下调肿瘤抗原呈递相关的 MHC I 类分子的表达（见补充材料 36）。通常是通过抑制 MHC I 类基因的转录来下调 MHC I

类分子的表达（信息栏 15.3）。事实上，目前已经发现许多类型的肿瘤细胞缺乏正常水平的 MHC I 类分子，因而阻止了寡肽抗原有效呈递至这些细胞的表面（图 15.27）。

信息栏 15.3　癌蛋白可以帮助肿瘤细胞逃脱免疫攻击　除了可以促进肿瘤细胞的增殖以外，有些癌蛋白还可以使这些肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击。有些肿瘤中，Myc 和 N-Myc 以及 L-Myc 均与肿瘤细胞的 MHC I 类分子表达下调相关。在儿童的神经母细胞瘤中，MHC I 类分子表达下调与 N-myc 基因的过度表达相关（4.5 节）。在黑色素瘤中，HLA-B（MHC I 类分子的一种类型）表达缺失与 *myc* 基因的过度表达相关。在小细胞肺癌（SCLC）中，过度表达的 L-Myc 基因与肿瘤细胞的 MHC I 类分子表达下调相关。

在许多这些肿瘤中，MHC I 类分子表达缺失似乎是一系列复杂事件的结果：过度表达的 N-Myc 和 L-Myc 蛋白阻断了另外一种称为 CIITA 转录因子的表达，而 CIITA 与干扰素-γ 介导的 MHC I 类和 MHC II 类分子的表达相关。尽管这样，在许多常见的肿瘤中，如黑色素瘤、结肠癌和前列腺癌，抑制 MHC I 类分子表达的分子机制目前尚不清楚。

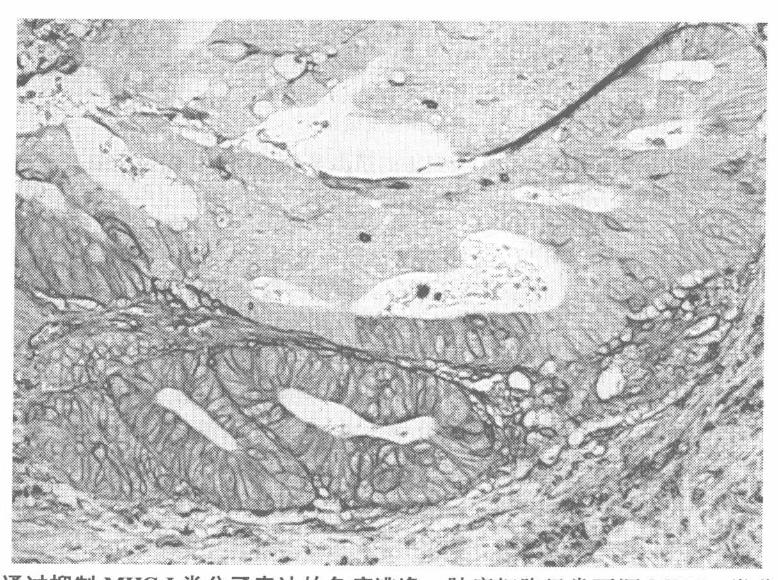


图 15.27　通过抑制 MHC I 类分子表达的免疫逃逸　肿瘤细胞经常下调 MHC I 类分子的表达，从表面上看是为了逃避适应性免疫细胞的识别和攻击。在这张免疫组化染色的组织切片中可以看到人的结直肠肿瘤细胞。它们被识别人类 MHC I 类分子——HLA-A 的单克隆抗体免疫染色。在这里可以看到，肿瘤组织的底层细胞强烈表达 HLA-A，而上层细胞出现部分或者完全的 HLA-A 表达缺失。（From A. G. Menon，H. Morreau，R. A. Tollenaar et al.，Lab. Invest. 82：1725-1733，2002.）

MHC I 类分子表达缺失常与具有更强的侵袭和转移性的肿瘤相关。例如，在超过一半的晚期乳腺癌中，这种在抗原呈递中发挥关键作用的表达分子几乎完全缺失，而这种表达缺失的肿瘤患者预后较差相关。此外，在骨髓中形成微转移灶的肿瘤细胞的 MHC I 类分子表达水平很低（图 14.10），这可能是由于在这种组织微环境中免疫细胞介导的免疫监视作用很强的缘故。

肿瘤细胞也可以采用转录后的机制来抑制 MHC I 类分子介导的抗原呈递。例如，MHC I 类分子从这些细胞内的内质网迁移至细胞表面的过程依赖于与它们相关的 β2-微

球蛋白（β_2m）。正常情况下，β_2m 能够护送结合有抗原肽的 MHC I 类分子表达于细胞表面（图 15.28A）。然而在某些高度恶性的肿瘤，β_2m 合成缺陷导致结合有抗原肽的 MHC I 类分子无法到达细胞表面。

此外，肿瘤抗原呈递的较早步骤也可能出现异常：在有些肿瘤中，发现 TAP1 或者 TAP2（抗原加工相关转运蛋白，transporter associ- ated with antigen presentation）表达存在缺陷（图 15.28C）。这两种蛋白能将蛋白酶体在胞浆中降解肿瘤抗原产生的寡肽运入内质网腔中与 MHC I 类分子结合。当缺乏这两种 TAP 蛋白时，MHC I 类分子无法介导有效的肿瘤抗原呈递。

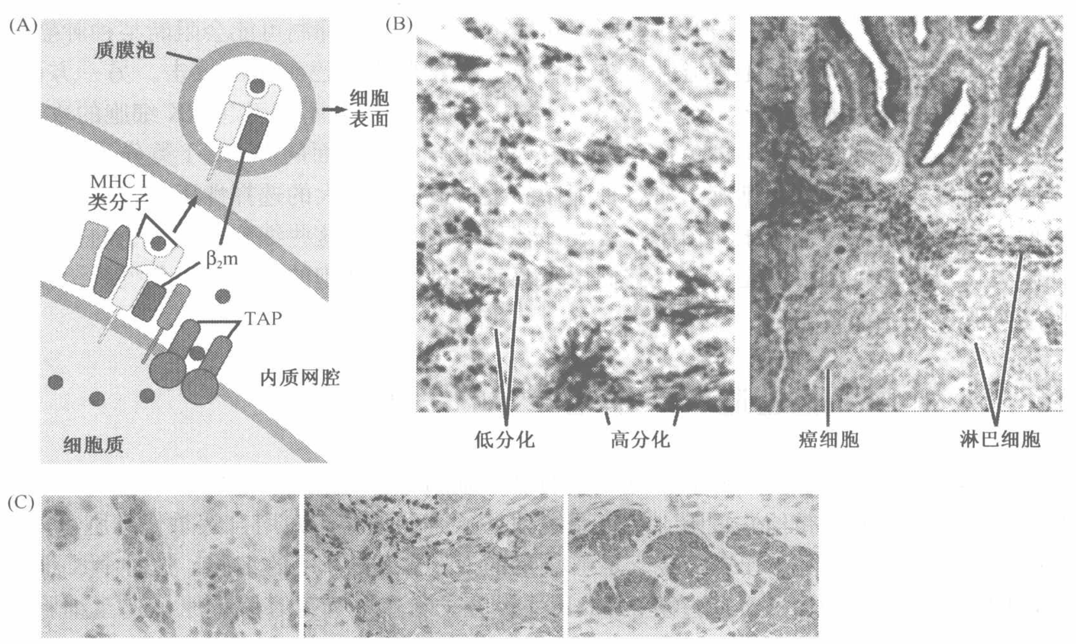


图 15.28　β2-微球蛋白或者 TAP1 表达缺失导致抗原呈递失败　（A）图 15.10A 详细的描述揭示 TAP（抗原呈递相关转运蛋白；绿色）复合物（TAP1 和 TAP2 蛋白的异二聚体）与寡肽（红点）从细胞质转运至内质网腔相关，在内质网腔中寡肽与 MHC I 类分子结合（黄色）。此外，β2-微球蛋白（β_2m，褐色）与 MHC I 类分子结合并且协助结合有寡肽抗原的 MHC I 类分子表达于细胞表面。为了到达细胞表面，MHC I 类分子需要结合的寡肽抗原和相关的 β_2m（见图 15.18B）。因此，β_2m 或者 TAP1 表达缺失阻止了细胞将抗原呈递至细胞表面。（B）在一例人结直肠癌中（左图），在形成分化程度较高的管状结构的肿瘤细胞中 β_2m 染色呈阳性（微红棕色），而在分化程度差的肿瘤细胞 β_2m 染色呈阴性（浅蓝色）。在另外一例结直肠癌中（右图），β_2m 表达于浸润性淋巴细胞（暗红）而在大多数肿瘤细胞表达缺失（浅蓝，下半图）。在 17 例检测到微卫星不稳定性的结直肠癌中的 5 例发现 β_2m 基因出现了失活突变，而在部分其他肿瘤中 β_2m 基因由于存在某种目前尚不清楚的机制出现了转录沉默。（C）在头颈部鳞状细胞（HNSCC）中经常出现 TAP1 和 TAP2 蛋白表达缺失而导致的抗原呈递加工的失败。免疫组化染色显示 TAP1 在头颈部鳞状细胞癌中表达成多样性：在有些肿瘤表达缺失（左图），在有些肿瘤呈片状表达（中图），在有些肿瘤表达水平正常（右图）。（A，from C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005；B，from M. Kloor，C. Becker，A. Benner et al.，Cancer Res. 65：6418-6424，2005；C，from M. Meissner，T. E. Reichert，M. Kunkel et al.，Clin. Cancer Res. 11：2552-2560，2005.）

因为它们仅仅是相关，这些 MHC 分子介导的抗原呈递缺陷的观察资料未证明这些缺陷能使肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击。能够证明 MHC 功能缺陷与肿瘤免疫逃逸存在直接关联的证据是有限的和零散的。例如，在一个接受抗肿瘤免疫治疗的黑色素瘤患者中，肿瘤细胞出现了 MHC I 类分子的表达下调，同时对治疗是抵抗的。在另外的例子中，如，神经母细胞瘤和小细胞肺癌，MHC I 类分子的表达缺失与缺乏肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL；15.9 节）相关，而它们是产生免疫攻击肿瘤细胞的关键成分。

事实上，当一个细胞表面的 MHC I 类分子表达完全缺失时，它就会引起 NK 细胞的攻击，后者不断在体内各组织中巡逻，寻找细胞表面 MHC I 类分子表达下调的细胞。这就解释了为什么有些肿瘤细胞只选择性地抑制正常情况下持续表达于体内细胞中的 6 种 MHC I 类分子中的一种。这种 MHC I 类分子表达的抑制可能会阻断某种肿瘤抗原的呈递，因此使肿瘤细胞逃避肿瘤抗原特异性的细胞毒淋巴细胞的攻击。另一方面，由于这些肿瘤细胞表面只有小部分 MHC I 类分子缺失，因此不会引起 NK 细胞的攻击。

总之，众多观察表明机体免疫系统通过识别肿瘤细胞表面的 MHC I 类分子和相关寡肽抗原复合物攻击肿瘤细胞，对各种肿瘤的生长造成了巨大的选择性压力，使癌细胞表面不再显示抗原呈递分子。由于在侵袭和转移的细胞中，这些细胞表面分子的显示往往缺失，早期的推测可能是，一旦它们侵入存有大量免疫细胞的基质时，免疫系统会对肿瘤细胞发动全面攻击。

15.15　肿瘤细胞逃避 NK 细胞介导的杀伤

本章前面已多次提及，肿瘤细胞可以通过下调细胞表面 MHC I 类分子的表达进行免疫逃逸，但同时也带给它危险：免疫系统预见了这种骗局，并用自然杀伤细胞（natural killer，NK）攻击在其表面缺乏足够数量的 MHC I 类分子的细胞。这种 NK 细胞反应同样可以挫败肿瘤病毒通过阻止 MHC I 类分子和这些病毒寡肽抗原呈递至细胞表面而躲避免疫监视的企图。

NK 细胞表面表达识别潜在靶细胞的 MHC I 类分子的受体（图 15.29）。靶细胞的 MHC I 类分子与 NK 的细胞表面的受体（称为杀伤细胞抑制性受体，KIR）结合后，这种受体向 NK 的细胞质中传递抑制性信号，阻止 NK 杀伤 MHC I 类分子表达阳性的细胞。相反，当 NK 细胞识别的靶细胞表面 MHC I 类分子表达缺失，那么这种抑制性信号的传递就会消失，从而 NK 细胞启动针对靶细胞的杀伤（这种 NK 细胞介导的MHC I 类分子表达缺失细胞的清除也许可以解释为什么在某些类型的人类肿瘤中，肿瘤细胞表面 MHC I 类分子表达缺失与患者好的预后呈正相关，这与前面提及的结果相反）。

此外，另一种 NK 细胞与肿瘤细胞之间的固有的相互作用也同样重要。这种相互作用依赖于许多类型肿瘤细胞遭受某些生理应激时，如病毒感染和细胞恶性转化、肿瘤细胞表面组成性地表达特定的蛋白。这些应激诱导的蛋白命名为 MICA、MICB、ULBP4 等（图 15.30A）。NK 细胞表面表达与这些应激诱导蛋白相应的受体，名为 NKG2D，它可以特异识别这些表达于靶细胞表面的应激相关蛋白（图 15.30B）。NKG2D 受体与这些蛋白结合后介导 NK 细胞的活化，并诱导出 NK 细胞的细胞毒反应，从而迅速杀灭表达这些应激相关蛋白的靶细胞。

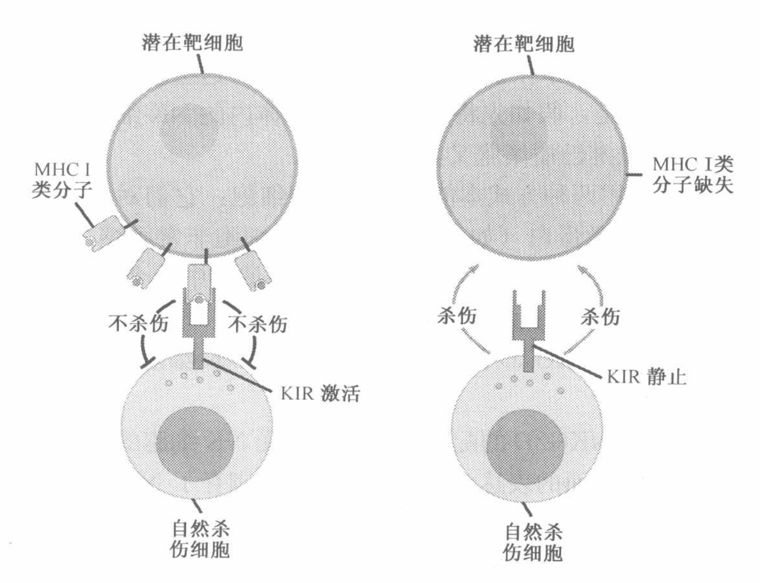
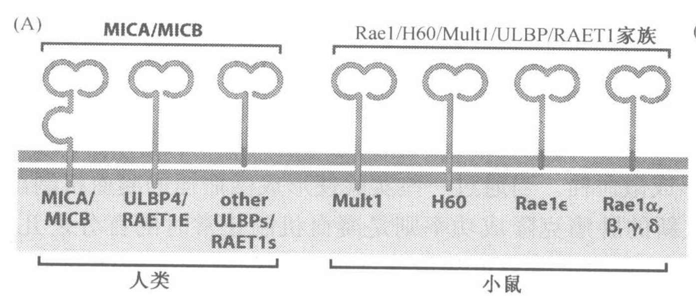


图 15.29 通过 KIR 受体控制 NK 细胞介导的杀伤 自然杀伤（NK）细胞（黄色，底部）表达识别潜在靶细胞（灰色，上面）表面 MHC I类分子的杀伤细胞抑制性受体（KIR，红色）。当发生这种识别时，KIR 传递的抑制性信号可以阻止 NK 细胞针对靶细胞的杀伤（左图）。反之，当缺乏这种识别时，KIR 无法传递抑制性信号，NK 细胞启动针对靶细胞的杀伤（右图）（注意 KIR 识别和结合 MHC I类分子的恒定结构部分，而不识别结合于 MHC I类分子抗原结合槽内的寡肽抗原）。



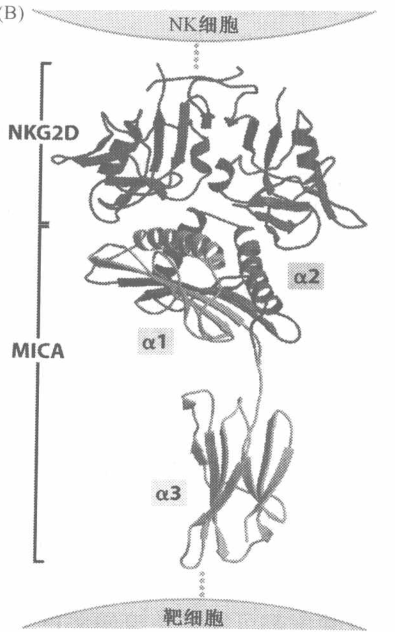


图 15.30 通过 NKG2D 受体调节 NK 细胞的功能 （A）NK 细胞的 NKG2D 受体可以结合靶细胞在病毒感染、肿瘤转化等应激条件下诱导表达的 NKG2D 各种配体。图中显示的是在人类和鼠中已经鉴定出的 NKG2D 各种配体。例如，MICA 和 MICB 正常情况下只表达于在应激诱导下的某些上皮细胞。(B) 图中显示的是 NKG2D 和它的配体 MICA 结合形成的复合物的分子结构。图中上半部分显示的是表达于 NK 细胞表面的 NKG2D 受体的两个亚单位（蓝色和紫色）。图中下半部分显示的是可能表达于肿瘤细胞表面的 MICA 胞外区的三个结构子域（浅褐色、红色和绿色）。图中未显示将这些蛋白锚定到 NK 细胞和肿瘤细胞表面的结构域。（A，from D. Raulet，Nat. Rev，Immunol. 3：781-790，2003；B，from P. Li，D. L. Morris，B. E. Willcox et al.，Nat. Immunol. 2：443-451，2001.）

为了证明这种动态关系，将人类MICA同源的小鼠抗原编码基因转染小鼠淋巴瘤细胞，使它们的细胞表面高水平表达这种抗原。因此将这些淋巴瘤细胞注入宿主小鼠时它们失去了成瘤性。但是，假如先将这些宿主小鼠体内的NK细胞清除，那么这些表达人MICA同源抗原的鼠淋巴瘤细胞又具有成瘤性。

总之，NK细胞使用两种方式本能的识别肿瘤细胞：它们对细胞表面MHC I类分子表达缺失或者表达应激蛋白（如MICA）的肿瘤细胞非常敏感。当这两种条件都满足时，那么NK细胞杀伤肿瘤细胞的作用会比仅满足其中一个条件的更为有效。事实上，有些免疫学家认为肿瘤细胞必须满足两种条件时（低水平表达MHC I类分子和高水平表达应激相关的NKG2D配体，如MICA），NK细胞才启动针对肿瘤细胞的杀伤。

由于肿瘤细胞表达NKG2D的配体蛋白，而遭受NK细胞的杀伤，因此肿瘤细胞通过抑制这些配体在细胞表面的表达，如MICA，从而剥夺了NK细胞识别肿瘤细胞的一种重要方式。尽管在少数肿瘤细胞中证实存在配体启动子的甲基化，但到目前为止并不清楚肿瘤细胞抑制这些配体表达的确切机制。

事实上，许多类型的人类肿瘤细胞和黑色素瘤细胞通过另外一种免疫逃逸策略使NKG2D信号通道失活：它们持续合成大量的MICA，但是将这些蛋白大部分脱落分泌到周围的基质中（而不是表达在细胞表面）。释放的可溶性的MICA可以在许多肿瘤患者的血清中被检测到，它可以作为一种诱饵配体结合NK细胞上的NKG2D受体。因此可溶性的MICA结合在NK细胞（和细胞毒性T细胞）上的NKG2D受体，可以造成这些受体的内吞和降解。因此使这些免疫细胞对持续表达在患者肿瘤细胞表面的MICA分子无反应。

在结束我们对于肿瘤细胞以及它们与NK细胞相互作用的讨论时，也该注意到在循环系统中转移的肿瘤细胞通过一条独特的路径逃避NK细胞的杀伤。就如补充材料27◎描述的那样，进入血管内的肿瘤细胞与血液直接迅速的接触，得到一种黏附血小板的保护屏障，它与肿瘤细胞一起形成微血栓。当通过一些实验使形成微血栓的凝血机制出现缺陷时，转移的肿瘤细胞形成新的肿瘤克隆成功率则是凝血机制正常时的百分之几。这种减少是由于NK细胞的攻击引起的，因为正常情况下血小板的保护屏障通常阻止NK细胞识别和攻击肿瘤细胞。这种独特的免疫逃逸策略并不是通过选择肿瘤中少量变异肿瘤细胞而发展起来的，相反，它几乎是随意发生的，所有进入循环中的肿瘤细胞都会常规地采用这种免疫逃逸机制，去往较远的遍及全身的组织形成新的肿瘤病灶。

15.16 肿瘤细胞对免疫细胞的反击

早期，我们了解到肿瘤细胞可以在免疫抑制的环境中（如移植物的受者体内）旺盛生长，肿瘤患者的免疫系统被免疫抑制剂破坏，再者就是AIDS患者。事实上，绝大部分肿瘤都可能在免疫缺陷的环境中生长。确切地说，肿瘤可以制造出破坏免疫功能的微环境。它们通过避开有功能的细胞毒性细胞，使其在机体的各部位处于安全地带。

前面曾描述的细胞毒性淋巴细胞杀死靶细胞通常所用的策略也被肿瘤采用：这些淋巴细胞的表面表达Fas配体（FasL），其可以结合和激活全身表达的Fas死亡受体的其

他类型细胞。两者结合可以激活外来凋亡途径（9.14 节）。

但是，许多肿瘤细胞通过两个步骤搅乱这个信号系统。首先，它们通过一种未完全明确的机制对 FasL 介导的杀伤产生耐受。例如，通过对多种凋亡的形式获得抵抗能力（见表 9.5）。肿瘤细胞保护自身不受 FasL 活化 Fas 受体引起的外来凋亡瀑布式激活的攻击。显然，这种抵抗为肿瘤细胞本身提供了一条逃避细胞毒性细胞（如细胞毒性 T 细胞）的杀伤途径。

第二步，通过获得产生和释放可溶性 FasL 的能力（图 15.31A 和 B），许多肿瘤细胞从一开始就扭转 FasL-Fas 系统。这种 FasL 不能侵袭肿瘤细胞，因为肿瘤细胞已经对其作用变得耐受。但是，一些研究表明这一配体能激活在几种淋巴细胞表面表达的 Fas 死亡受体，诱导它们的死亡。通过对周围的免疫细胞发起这样的反击，肿瘤细胞使自身处于安全的地带，再次减小被杀伤的概率。

在许多肿瘤患者中，有证据表明某些类型的循环系统中的淋巴细胞处于抑制的水平，说明免疫功能系统性缺陷。例如，在口腔癌患者中可以在循环系统中找到膜结合的有生物学活性 FasL 的膜状囊泡（图 15.31C）；这些囊泡似乎由肿瘤细胞释放，并能抑制全身淋巴细胞的功能。对于口腔癌和人类其他类型肿瘤的生长来说，这种独特的免疫抑制机制的重要性还需要进一步的论证。

许多类型的人类肿瘤细胞采用另一种反击方式，即释放白细胞介素-10（IL-10）或是 TGF-β。这两种分泌的蛋白均能有效地进行免疫抑制，并能诱导 T 淋巴细胞凋亡。此外，TGF-β 还能诱导免疫系统中两种关键的抗原呈递细胞——树突状细胞和巨噬细胞凋亡。

有趣的是，已获得并改变了细胞 IL-10 基因的 EB 病毒模拟了人类肿瘤细胞释放的 IL-10。正如我们所了解到的那样（3.4 节），这种病毒是 Burkitt 淋巴瘤、B 细胞来源的其他淋巴瘤、鼻咽癌的一个重要致病因素。通过促使病毒感染的细胞释放 IL-10 样的细胞因子，Epstein-Barr 病毒保护这些细胞不受细胞毒性免疫细胞的直接攻击，因此在长时间内能保证自身有一个安全的避风港。

一组实验特别说明了 TGF-β 的免疫抑制能力和证明了旧格言的正确性，即最好的防御就是发动先发制人的攻击（图 15.32A）。在这些实验中，一组 10 只小鼠均被注入一种可以分泌高水平 TGF-β 的小鼠黑色素瘤细胞；所有的老鼠均在 45 天内死于肿瘤。在另一组中，向小鼠的骨髓中移植基因改变的，表达明显负性（dn）的 TGF-βII 受体（其封闭正常的受体功能）的造血干细胞，使小鼠的淋巴细胞第一次对 TGF-β 介导的杀伤产生耐受。当相同的黑色素瘤细胞系注入这组小鼠后，10 只中的 7 只在 45 天后仍然存活。检查它们的肺脏，发现黑色素瘤转移显著减少（见图 15.32B）。同样的结果在前列腺癌细胞移植入正常的小鼠和用上述方法进行骨髓细胞改造后的小鼠中也可以观察到。

这些观察表明黑色素瘤和前列腺癌细胞通过释放 TGF-β 保护自己不被免疫细胞杀伤。但是，一旦宿主的免疫细胞对 TGF-β 介导的凋亡产生抵抗，这些免疫细胞就能有效地杀灭肿瘤细胞，而且，在造血干细胞表达 dn 的 TGF-βII 受体的荷瘤小鼠中，可从脾中重新获得具有在体外杀伤黑色素瘤细胞能力的细胞毒性淋巴细胞。这种脾淋巴细胞在对照动物中完全不存在，它们的淋巴细胞缺少这种受体。

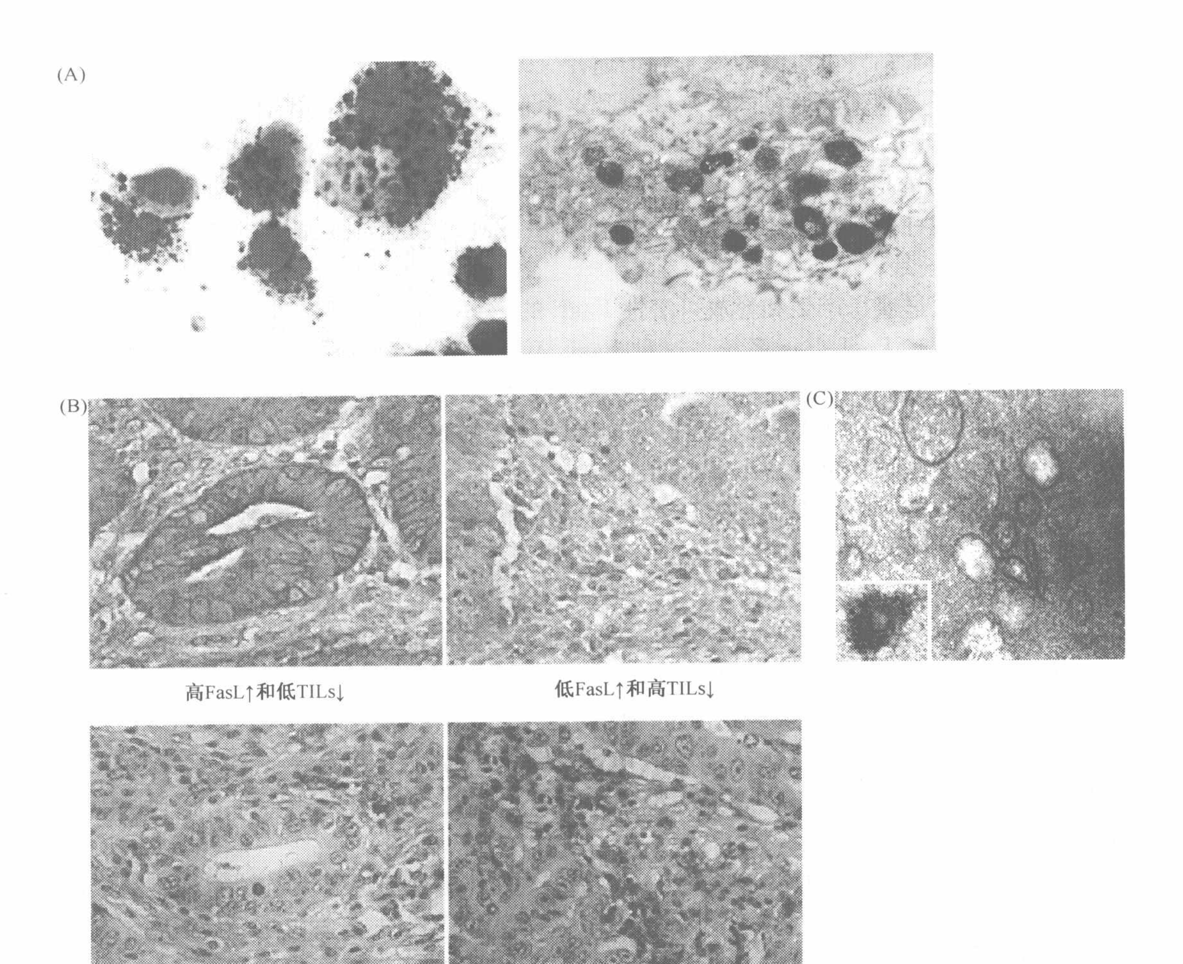


图 15.31　FasL 对免疫逃逸所起的作用　一些肿瘤细胞通过两个步骤能保护自己不受 T 淋巴细胞的杀伤。首先，它们获得对 FasL，即 Fas 死亡受体配体杀伤的抵抗。第二，它们获得产生和释放 FasL 的能力，这使它们可以杀伤那些离群且和它们靠得很近的淋巴细胞和其他细胞。(A) 当黑色素瘤细胞用抗 FasL 抗体染色时（左），可以看到大量的 FasL 在细胞质中浓缩成泡状（红），细胞核是染成蓝色，用免疫电子显微镜可以看得更加清晰（右图）。这表明黑色素瘤细胞上的 FasL（大黑点）事实上位于黑色素体（正常黑色素细胞中携带黑色素分子的细胞质体）。黑色素瘤细胞可以释放黑色素体进入细胞外的空间，在那里 FasL 获得诱导表达 Fas 细胞死亡的能力，如一些邻近的淋巴细胞。(B) 在一个结肠腺癌中，高水平表达 FasL（棕）的肿瘤区域（上左）显示肿瘤浸润的淋巴细胞（TIL；红，底左）处于非常低的水平（在另一个组织切片），相反的是，FasL 低水平的区域（棕，上右）显示 TIL 处于高水平（红，下右）。在高水平的 FasL 区域附近的 TIL 表现出较高的凋亡率（没有显示）。(C) 对于在口腔癌患者中观察到循环系统中功能性 T 细胞经常处于抑制状态的一种解释可能是大部分的患者（不是正常的对照）在他们的循环系统中含有显示膜结合 FasL 的膜状微泡，它们是一种特殊有效的死亡受体配体诱导凋亡的形式。这些微泡是从这些患者的血清中提纯的，可以用免疫电子显微镜观察到（见 A 图），其包含一个膜结合 FasL（黑点，插图）。(A, left, from G. Andreola, L. Rivoltini, C. Castelli et al., J. Exp. Med. 195：1303-1316, 2002; A, right, from L. Rivoltini, M. Carrabba, V. Huber et al., Immunol. Rev. 188：97-113, 2002; B, from A. Houston, M. W. Bennett, G. C. O'Sullivan et al., Brit. J. Cancer 89：1345-1351, 2003; C, from J. W. Kim, E. Wieckowski, D. D. Taylor et al., Clin. Cancer Res. 11：1010-1020, 2005.)

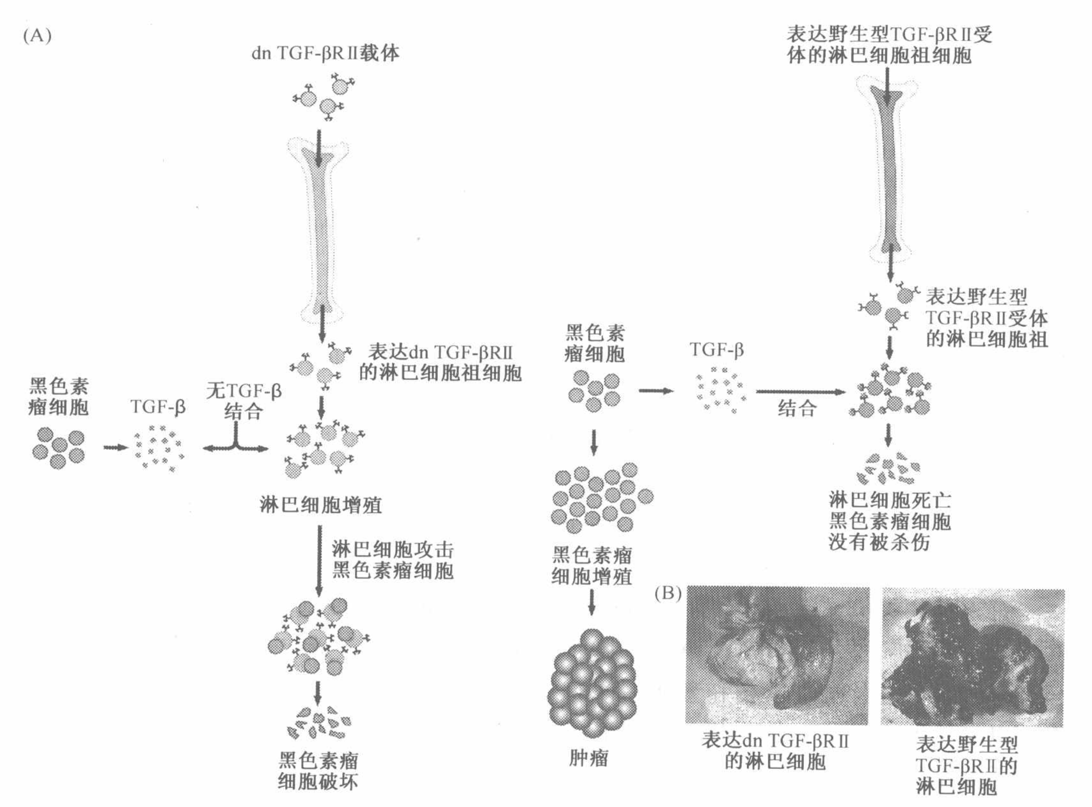


图 15.32 TGF-β 在免疫反应中所起的作用 （A）如果将表达明显负性的 TGF-βII 受体（dn TGF-βRII，上部）淋巴细胞的祖细胞注入小鼠的骨髓中，形成分化的淋巴细胞（绿），对 TGF-β 的杀伤作用没有反应（左图）。如果黑色素瘤细胞（粉红，左）注入一个携带有这种淋巴细胞的小鼠中，尽管这些黑色素瘤细胞分泌大量的 TGF-β（正常情况下对淋巴细胞有毒性；浅褐色的四边形），但淋巴细胞旺盛生长并且杀灭这些黑色素瘤细胞，因此阻碍了肿瘤的形成。相反，当相同的黑色素瘤细胞导入一个移植了表达野生型（wt）TGF-βII 受体（右图）淋巴细胞祖细胞的宿主小鼠，由黑色素瘤细胞释放的 TGF-β 引起表达正常功能的 TGF-β 受体的淋巴细胞（蓝）进入凋亡（下图）。这证明了分泌 TGF-β 是这些黑色素瘤细胞保护自己免受免疫攻击一个非常有效的方法。（B）通过有颜色的黑色素瘤形成肺转移的相对能力揭示了形成肿瘤能力的明显差异。野生型的 C57/BL6 小鼠迅速发生转移（黑点，右图），而那些 T 细胞表达明显负性的 TGF-β II 受体（dn TGF-βRII）小鼠却能够有效地阻止转移（左图）。这些肺是从静脉注射 B16 黑色素瘤细胞 21 天后进行观察的。(From data of L. Gorelik and R. A. Flavell, Nat. Med. 7：1118-1122，2001；B，from A. Shah，W. B. Tabayoyong，S. D. Kundu et al.，Cancer Res. 62：7135-7138，2002.)

（这些实验可能提示一种新型的抗肿瘤疗法的轮廓，即将肿瘤患者的骨髓细胞改造成对 TGF-β 介导的凋亡产生抵抗，用这些细胞高效地攻击许多释放 TGF-β 的人类肿瘤。不幸的是，一旦免疫细胞对 TGF-β 失去应答能力，它们常常在全身的组织中发动破坏性的自身免疫攻击，使机体比患有肿瘤时更加衰弱和更快死亡）。

实验结果表明，将 TGF-β 反义基因结构插入这些肿瘤细胞，它们释放 TGF-β 的能力会大大降低。这些肿瘤细胞大部分失去形成肿瘤的能力，主要因为它们被众多的能将其杀灭的细胞毒性淋巴细胞所包围。

总之，众多的实验表明即使细胞毒性 T 细胞成功获得抗肿瘤细胞的适应性免疫反应能力，由于肿瘤细胞的许多防御机制使这些 T 细胞和它们的合作者 NK 细胞对其杀伤仍然常常受阻。至少有三种物质——TGF-β、IL-10 和 FasL 被认为是肿瘤细胞用来反击众多威胁它们的免疫细胞的武器。因为对于抗体包被的肿瘤细胞的杀灭通常是由细胞毒性的免疫细胞来执行的（如 NK 细胞、巨噬细胞；图 15.3）。当患者的循环系统中具有高水平抗肿瘤抗体时，这些分泌的免疫抑制物可能会保护肿瘤细胞不被杀伤。

15.17 肿瘤细胞对免疫系统的各种杀伤形成固有的抵抗

肿瘤细胞可能也会改变它们自身的生化特性，使它们天生对免疫系统的攻击产生较弱的反应性。如前面已经提到的：一些肿瘤细胞对几种细胞毒性的免疫细胞释放的 FasL 具有抵抗性。它们通过改变 Fas 死亡受体下游的信号转导通路，对众多免疫细胞释放的 FasL 变得相对不敏感。

有一种相关的防御手段显示出细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞杀伤包括肿瘤细胞在内的靶细胞的另一种主要机制。淋巴细胞将一种蛋白酶（颗粒酶）导入靶细胞（9.14 节和 15.3 节），这种酶能剪切和激活一种 caspase 蛋白酶原而诱导靶细胞的凋亡。肿瘤细胞可以简单地通过增加某些凋亡抑制蛋白（IAP）逃脱这种杀伤机制，IAP 是通过隔离和灭活关键的前凋亡 caspase（9.13 节）来运作的。

这两种逃逸杀伤的策略是我们之前在第 9 章中讨论机制的拓展，第 9 章中讲到获得对于凋亡的抵抗是肿瘤的特点之一。因此，免疫启动的细胞毒性现在被称为另一种生理学应激性刺激。生理学应激性刺激包括组织缺氧、细胞内信号传递失衡、锚定点的丢失，这些迫使肿瘤生长的过程中的前凋亡信号通路失活。

通常在肿瘤患者的循环系统中有大量抗肿瘤抗体，提示他们的肿瘤细胞可能携带结合的抗体分子，就如我们从图 15.9 了解到的，这些细胞容易被一群血浆蛋白组成的补体所杀灭。在参与补体依赖的细胞毒性的过程中（CDC），补体分子联合绑定在细胞表面的抗体分子上，在附近的细胞膜上释放穿孔素，导致细胞的迅速死亡。正常细胞通过在其质膜上表达一种或是几种抗补体的蛋白来保护自身不被补体意外杀伤，这些蛋白被称为膜结合补体调节蛋白（mCRP），其中最重要的是 CD46、CD55 和 CD59。

这些膜结合补体调节蛋白在多种类型的人类肿瘤细胞的表面均过度表达。这一过度的表达为肿瘤细胞提供了一条不被补体依赖的细胞毒性杀灭途径（图 15.33）。对于多种类型肿瘤细胞中上调 mCRP 表达的重复观察提示，这些肿瘤细胞的祖先在它们进展中曾经受到补体依赖的细胞毒性的威胁，作为回应，过度表达一种或不同种 mCRP 蛋白能抵抗杀伤的变异的肿瘤细胞被选择出来（有趣的是，疱疹病毒 saimiri，一种剧毒的疱疹病毒，可以使新大陆猴患上淋巴瘤和白血病。这种病毒表达一种蛋白质，与人类 CD59 mCRP 密切相关。它显然可保护病毒感染的细胞不被宿主的补体迅速杀灭）。几种其他保护肿瘤细胞抵抗补体依赖细胞毒性的机制虽已被描述，但是仍然缺乏研究。

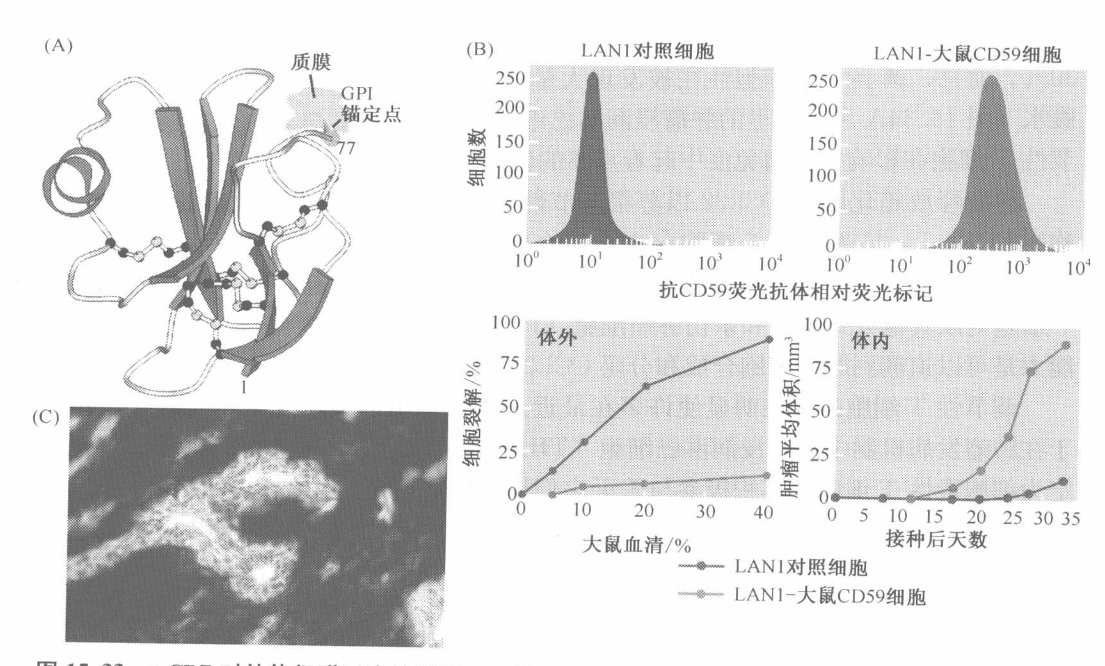


图 15.33 mCRP 对补体级联反应的调控 mCRP（CD46、CD55 和 CD59）是结合在膜上的补体级联反应的抑制物，能保护细胞不被补体介导的细胞溶解所破坏，常常过度表达在人类的肿瘤细胞上。(A) CD59 是一种糖蛋白，被一个磷酸肌醇（GPI）锚定（棕色）在细胞膜（图中分子的后面）上。这里显示的 CD59 的结构是由核磁共振（NMR）确定的。CD59 结合在特定的补体成分上，因此阻止了介导补体溶细胞作用的膜攻击复合物（MAC）的形成。CD59 在结构上与 uPAR 受体（见图 14.34）和一些具有蛇毒性的神经毒素相关。半胱氨酸的碳和硫残基（黑色、黄色）、α 螺旋（绿色）、β 片层折叠（碧绿色）被明显的标示出来。(B) 对大鼠的补体的细胞溶解作用十分敏感的人类 LAN1 神经母细胞瘤，用一种表达载体转染，使其过度表达大鼠的 CD59 mCRP 蛋白，如荧光激活细胞分选（FACS）分析（左上和右上）看到的那样，使 CD59 比正常的 LAN1 细胞（左）表达水平高了 20～30 倍（右）。当这两个细胞群在一种含有大鼠血清和一种可以激活血清中存在的补体的抗体培养基中进行体外培养后，这些过度表达 CD59 的细胞没有遭到补体介导细胞溶解的破坏（蓝色曲线），相比之下，那些未经过处理的 LAN1 细胞却对补体介导的细胞溶解高度敏感（红色曲线）。当将这两种细胞系注入免疫抑制的裸大鼠（右下），LAN1 细胞形成肿瘤的速度很慢（红色曲线），而那些过度表达 CD59 的细胞形成肿瘤的速度却非常快（蓝色曲线）。这表明补体介导的杀伤通常可以阻止这些小鼠体内 LAN1 肿瘤的生长。(C) 这张人类乳腺导管肿瘤切片的免疫荧光显微照片中，CD59 在形成导管的肿瘤细胞（绿）中强烈表达，而在周围的基质组织中几乎不染色（因为 CD59 通过 GPI 松散的锚定在导管上皮细胞的管腔面，它被大量的释放进入管腔中而产生强烈的黄色）。(A，from C. M. Fletcher，R. A. Harrison，P. J. Lachmann and D. Neuhaus，Structure 2：185-199，1994；B，from S. Chen，T. Caragine，N.-K. V. Cheung，and S. Tomlinson，Cancer Res. 60：3013-3018，2000；C，from J. Hakulinen and S. Meri，Lab. Invest. 71：820-827，1994.)

15.18 肿瘤细胞吸引调节性 T 细胞以阻挡其他淋巴细胞的攻击

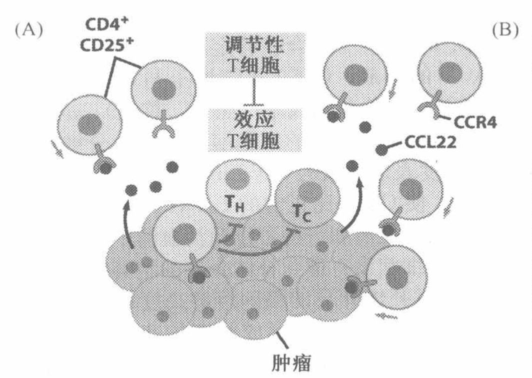
调节性 T 细胞（T_{reg}）[一种最近确定具有特色的淋巴细胞类型（15.6 节）] 似乎在肿瘤细胞的免疫逃逸机制中也起着重要的作用。募集这些调节性 T 细胞，能直接抑制甚至杀伤与调节性 T 细胞识别相同抗原的细胞毒性和辅助性 T 淋巴细胞（在任何情况下，抗原可以被多种 T 淋巴细胞表达的 T 细胞受体所识别）。

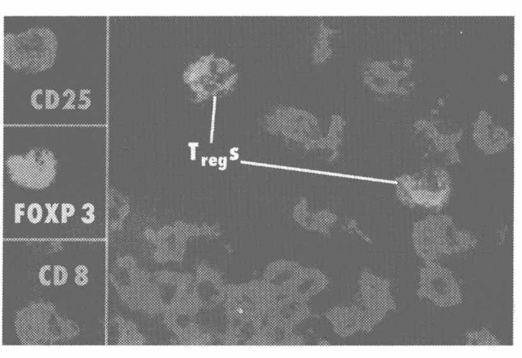
在正常的个体中，调节性 T 细胞仅仅占 $CD4^+$ 淋巴细胞群的 5%～10%，而剩余的

均是辅助性 T（T_H）淋巴细胞。但是在肿瘤患者体内，这一数字可以升高至 25%～30%。而且，调节性 T 细胞往往被发现大量存在于肺、卵巢、乳腺、胰腺肿瘤和肿瘤腹水（图 15.34A 和 B）里的肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）中。总之，众多的观察表明调节性 T 细胞在影响抗肿瘤免疫中起着重要的作用。

肿瘤释放趋化因子 CCL22 以募集调节性 T 细胞：后者在其表面表达同源性受体，称为 CCR4。一旦调节性 T 细胞存在于一个肿瘤中就可以抑制辅助性 T 细胞的作用。辅助性 T 细胞在适应性免疫应答中对体液和细胞成分的动员起辅助作用，而细胞毒性 T 细胞则以其他方式攻击和杀伤肿瘤细胞（15.1 节）。因此，实现这一免疫逃逸策略的能力是可以追溯到肿瘤细胞合成和分泌 CCL22 的能力上的。

调节性 T 细胞的存在明显使许多在最近几年中得出的结论复杂化。这些结论是关于在肿瘤发病机制中肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）所起的作用。这些淋巴细胞广泛地被认定为细胞毒性 T 细胞，其积极参与杀灭它们周围的肿瘤细胞。但是，如果调节性 T 细胞在一些肿瘤的 TIL 中构成相当大的比例，那么这些肿瘤中存在的 TIL 数量的意义就不清楚了。这意味着对细胞毒性 T 细胞和调节性 T 细胞相对比例的评估将有利于理解肿瘤与宿主细胞免疫反应相互作用的真正动态。在图 15.34C 中描述的观察表明许多肿瘤相关的细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）的功能紊乱的状态可以用它们中间存在许多调节性 T 细胞来解释。因此这些调节性 T 细胞是免疫系统能否控制肿瘤的关键决定因素。





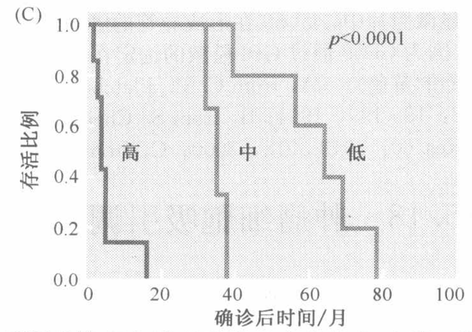


图 15.34 调节性 T 细胞和肿瘤免疫逃逸 （A）肿瘤细胞（粉红）释放 CCL22 趋化因子（紫色小圆点），其结合在调节性 T 细胞表达的 CCR4 趋化因子受体（蓝）上，通过这条路径吸引它们进入肿瘤。一旦它们被募集，表达 CD4 和 CD25 细胞表面抗原的调节性 T 细胞可以抑制两种“效应性 T 细胞”——$CD4^+CD25^-$辅助性 T（T_H）淋巴细胞（浅绿）和 $CD8^+CD25^-$细胞毒性（Tc）淋巴细胞（浅橙）。这些措施能削弱宿主大部分成分对肿瘤的免疫应答。（B）免疫荧光染色通过标记 CD25 表面抗原（红）和 FOXP3 的转录因子（绿）显示调节性 T 细胞的存在。它们存在于 CD8 阳性的细胞毒性 T 细胞中（蓝），对其作用进行抑制，这些淋巴细胞均来自于卵巢癌患者的腹水中。（C）晚期（IV 期）的卵巢癌患者，肿瘤切片中的肿瘤浸润的调节性 T 细胞的浓度可以对长期存活进行有效的预测，如 Kaplan-Meier 图所示。（A，from E. M. Shevach，Nat. Med. 10：900-901，2004；B and C，from T. Curiel，G. Coukos，L. Zou et al.，Nat. Med. 10：942-949，2004.）

15.19 用赫赛汀的被动免疫杀灭乳腺癌细胞

至今，我们在思索这样一个问题：人类的免疫系统在保护我们不受自然生长的肿瘤侵害中到底有多大的有效性。这一问题的答案肯定很复杂，而且会引起激烈的争论。但是，这场争论的最终解决并不能预见另一个问题的答案，即是否能巧妙地处理肿瘤患者的免疫系统，杀伤已经在全身许多部位形成的肿瘤。

两种类型的处理策略可以被接受。一种重要的策略是，通过激活或增强患者的免疫系统对肿瘤发起攻击，这包括使用某些免疫刺激因子，激活那些有效进攻的免疫细胞的发育和增殖。增强抗肿瘤免疫的功能也可以通过使患者接触肿瘤表达的肿瘤相关抗原或是肿瘤特异抗原来实现，它是通过与接种抗病毒或抗细菌感染的疫苗相类似的方法使患者对肿瘤产生有效的免疫。

另一种治疗策略包括多种形式的被动免疫。运用这一种策略意味着即使在免疫激活治疗运用之后，患者自身的免疫系统也不能发起有效的攻击。这种治疗策略包括给患者提供免疫制品（如抗体）或是来源于另一生物体的免疫系统中的细胞（免疫学家保留着“被动免疫”这一名称，因为其步骤是将抗体导入患者体内，但是我们这里用这一名称具有更广泛的含义）。当提供的细胞是来源于另一个体的免疫系统时，这一过程通常称为过继转移（adoptive transfer）。我们先介绍被动免疫的众多形式，然后在下一节中将回到免疫激活策略的讨论中来。

最著名的被动免疫治疗是一种被称为 Herceptin（赫赛汀）的单克隆抗体，它又被开发者称为 trastuzumab。赫赛汀来源于小鼠单克隆抗体，它与 EGF 受体相关蛋白，具有多种名称的 HER2、erbB2 或 Neu（4.3 节和 5.6 节；表 5.2）产生强烈反应；像我们之前阅读到的那样，这种受体在西方 30%的乳腺肿瘤中过度表达。

但 HER2 蛋白并非是肿瘤特异性抗原，当细胞表达异常高水平的 HER2 蛋白（通常高于正常的 10～100 倍）可能会成为被赫赛汀优先作用的靶细胞。这种优先杀灭肿瘤细胞的选择性，直接源于正常和肿瘤细胞之间的差异，即乳腺癌细胞过度表达 HER2。这一过度表达，通常是由于受体编码基因的扩增，一般代表不良的预后，往往涉及那些在初诊后几年中即恶化的疾病（图 4.6）。

为了制造赫赛汀，一种抗 HER2 的小鼠单克隆抗体最先被研制。但是，这种单克隆抗体，就像所有鼠科动物的抗体那样，不能直接用于人类抗肿瘤治疗，因为这种抗体的恒定区具有鼠源性（见图 15.1），其自身就是有效的免疫原，因此可以刺激人类的免疫系统产生高水平的人类抗体，以结合并中和小鼠抗体分子。而且这些人抗鼠抗体（HAMA）偶尔会造成使用这种小鼠抗体进行重复治疗的患者发生过敏性休克。

因此，通过重建编码鼠抗 HER2 抗体的 cDNA 后，其编码的抗体分子恒定区（C）是由人的序列而不是鼠的序列组成。我们希望制造出来的“嵌合性”抗 HER2 单克隆抗体（图 15.35）注入患者体内后通常没有免疫原性。重要的是，注射后发现嵌合的赫赛汀分子以有效的水平在循环中保留一个月左右，表明缺少明显的宿主免抗赫赛汀的免疫反应，并能发挥长时间治疗作用的潜能［对这一抗体的进一步改造，即在抗体可变区（V）位于抗原结合位点外面的一部分区域，用人的序列替代小鼠序列，从而制造出人

源化抗体。这种人源性赫赛汀比嵌合抗体具有更少的小鼠抗原决定簇]。

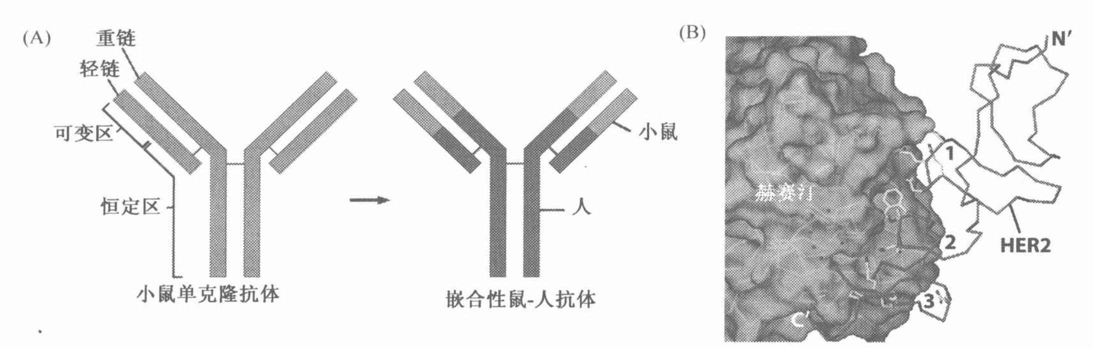


图 15.35　治疗抗体的人源化　(A) 在小鼠体内制造的单克隆抗体 (MoAb) 通常不能在人体内长期用于治疗，因为当小鼠抗体注入人体中，抗体重链和轻链的恒定区 (左图) 自身具有免疫原性，因此就会在被治疗的患者体内刺激产生抗单克隆抗体血清。这些抗体可以中和注入的单克隆抗体的作用。为了解决这个问题，编码小鼠单克隆抗体重链和轻链的 cDNA (蓝) 被克隆，处于重链和轻链的可变区的编码小鼠单克隆抗体的抗原结合域的 DNA 片段与编码人类抗体恒定区的基因 (红) 融合成没有免疫原性或较弱免疫原性的嵌合性抗体。(B) X 射线晶体衍射学研究确定了赫赛汀和 HER2 分子复合物详细结构，其分辨率在 2.5Å。赫赛汀的抗原结合域的表面 (这里就如同抗体的 Fab 蛋白水解片段，碧绿) 识别和结合位于 HER2 外功能区 4 个子域之一，称为子域 IV (右) 的抗原决定簇 (红，黄色箭头)。HER2 残基中接触到赫赛汀的侧链是用黄色箭头指示。这一 HER2 子域直接接触受体跨膜结构域，在那里穿过质膜 (见图 15.38B)。(A，adapted from R. A. Goldsby et al.，Immunology，5th ed. New York：Freeman，2002；B，from H. S. Cho，K. Mason，K. X. Ramyar et al.，Nature 421：756- 760，2003.)

运用赫赛汀抗体能延长肿瘤中过度表达 HER2 蛋白乳腺癌患者的生存期。赫赛汀很少单独使用，而是和一些已经确定疗效的化疗药物联合用药治疗乳腺癌。在一个大规模的临床实验研究中，将赫赛汀与晚期乳腺癌女患者的标准化学疗法联用，可以使疾病进展期延长 (7.4 个月，二者联合；4.6 个月，单用化学疗法)，一年内死亡率降低 (22 %∶33%)，存活期延长 (25 个月∶20 个月)。

令人印象更加深刻的消息是在 2005 年宣布的：处于可以手术的早期过度表达 HER2 的乳腺癌女患者实行手术后，单用化疗方案或是联合使用赫赛汀对其进行治疗。这些妇女大部分有引流淋巴结的转移 (见图 14.41)。4 年后，接受联合用药的妇女中仅有 15% 肿瘤复发，而单用化疗方案的妇女中有 33% 肿瘤复发。尽管还没有得到证实，但赫赛汀治疗的长处在这一研究中得以体现。其治疗的优点是能阻断原发肿瘤切除后残余肿瘤细胞的增殖，如果缺乏赫赛汀，这些肿瘤细胞可能对手术后伤口愈合时产生的有丝分裂原起反应。这一结论现在仍存在争议 (见信息栏 13.4)。

赫赛汀抗体是如何杀灭过度表达 HER2 的乳腺癌细胞的确切机制仍然是一个值得争议的问题。杀灭肿瘤细胞的一个重要机制是由于多种细胞毒性细胞和吞噬细胞的表面有 Fcγ 受体的存在，包括最重要的 NK 细胞和巨噬细胞 (图 15.36；也可见图 15.3)。这些 Fcγ 受体与包被其他细胞 (如赫赛汀处理的乳腺癌细胞) 上的免疫球蛋白 γ (IgG) 抗体分子的恒定区结合。这些抗体结合在表达 Fcγ 受体的细胞毒性细胞上，后者将存在的靶细胞杀灭。因此，NK 细胞和巨噬细胞通过它们的 Fcγ 受体缩短了与 IgG 抗体结合

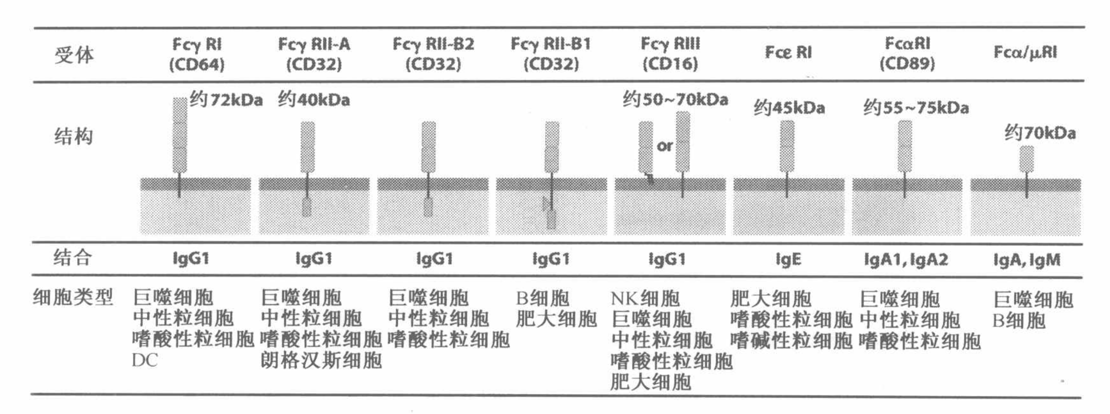


图 15.36 免疫细胞中表达的 Fc 受体 许多类型的免疫细胞通过 Fc 受体（绿）结合到抗体分子的恒定区（见例，图 15.3）。一旦抗体分子结合到一个靶细胞的表面抗原上后，多种免疫细胞就通过 Fc 受体结合到该抗体上，刺激其自身活化，并攻击靶细胞。如这里看到的，多种 Fc 受体变异体是由免疫系统进化而来的，它们都有 Fcγ 受体的亚类。例如，其特异性的结合在 IgG 抗体分子的恒定区。（From C. A. Janeway Jr. et al.，Immunobiology，6th ed. New York：Garland Science，2005.）

的肿瘤细胞的距离，并且杀伤肿瘤细胞——这一过程被称为抗体依赖细胞的细胞毒（antibody-dependent cellular cytotoxicity，ADCC）。

通过敲除特异性编码 Fcγ 受体的基因得到一种免疫缺陷小鼠。在这样的小鼠中，依赖赫赛汀杀伤移植的人类乳腺癌细胞能力极大的降低，这为 ADCC 是赫赛汀启动细胞杀伤的关键机制提供了直接证据。有趣的是，赫赛汀的疗效似乎在某些肿瘤患者中打了折扣，仅仅是因为他们的 NK 细胞低于正常水平，而 NK 细胞是赫赛汀治疗过程中发生 ADCC 的主要参与者。总之，众多的观察资料表明赫赛汀对于肿瘤细胞的杀伤大部分取决于 NK 细胞和它们的 Fcγ 受体。这一杀伤可以被改造的赫赛汀分子所加强（补充材料 44 ◎）。

但是其他机制也有助于赫赛汀介导的杀伤。例如，当许多细胞表面蛋白结合反应性抗体，这些蛋白可以被内化和降解。同样的过程也能导致赫赛汀介导乳腺癌肿瘤细胞表面表达 HER2 减少。HER2 的减少不能激活使乳腺癌细胞免于凋亡的 dPI3 激酶和 Akt/PKB，因此使这些肿瘤细胞对杀伤性放射线和化疗方案更敏感（图 15.37）。

在许多乳腺癌中，一旦 HER2 蛋白到达细胞表面，其胞外区可以被细胞外的蛋白酶酶切。剩余的蛋白残基（包括 HER2 跨膜的和细胞质内的酪氨酸激酶功能域）可以组成性地激活激酶的功能，因此是一种有效的原癌蛋白（如见图 5.11）。HER2 翻译后剪切产生这种解除控制的受体蛋白可以通过赫赛汀的结合来阻断。

但是其他可能有助于赫赛汀抗肿瘤作用的机制也许是与它抗血管再生有关：HER2 受体的配体被认为是由内皮细胞释放的，能在毛细血管形成过程中对募集周围细胞和平滑肌细胞起辅助作用。就像我们了解的那样，这一募集对于血管的形成具有关键的作用，包括那些在肿瘤中形成的血管（13.1 节）。赫赛汀使这一募集减少也许可以解释它是如何在多种肿瘤中均能发挥抗血管形成作用的。另一个能结合 HER2 的单克隆抗体和一个能与 EGF 受体（HER1）反应的抗体也已经研制出来。它们的功能不同于赫赛汀，也许最终具有更强的功效（信息栏 15.4）。

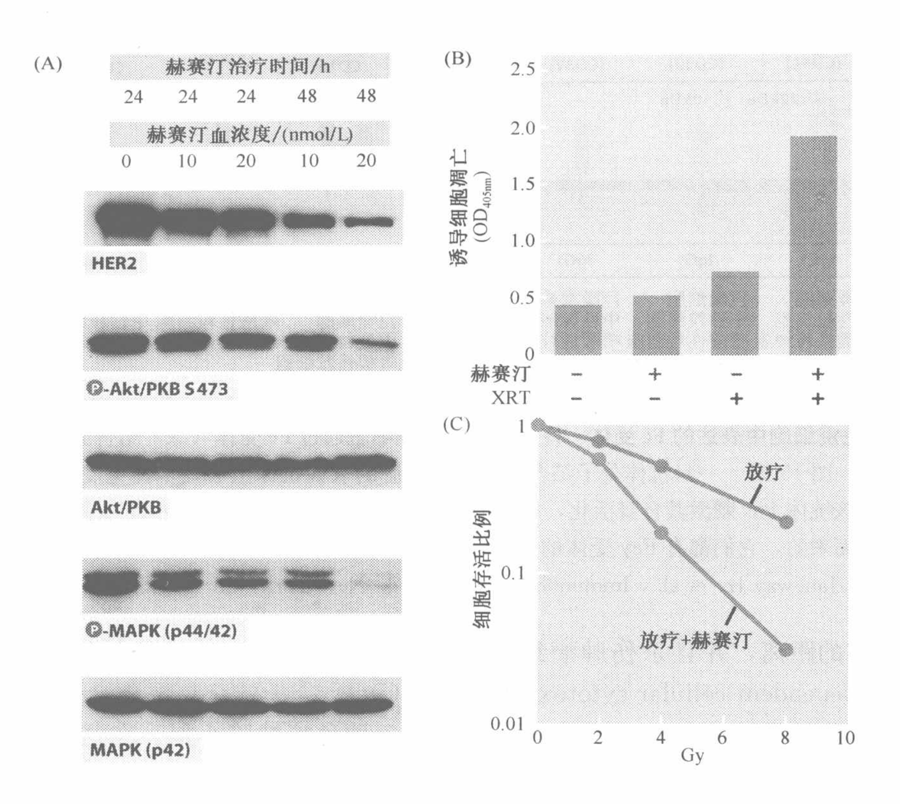


图 15.37 赫赛汀治疗乳腺癌细胞 赫赛汀对过度表达 HER2/Neu 的乳腺癌细胞具有多重作用。实验中显示，MCF7 人类乳腺癌细胞过度表达 HER2/Neu 受体蛋白。(A) 将赫赛汀孵育时间延长后，HER2/Neu 的水平下降十分明显，其下降的程度与赫赛汀的浓度和体外治疗的时间呈正比。与此同时，磷酸化的抗凋亡的 Akt/PKB 和促有丝分裂的 MAP 激酶的活化水平 (6.5 节和 6.6 节) 急速下降 (虽然这两种蛋白总的水平没有改变)。(B) 用赫赛汀对肿瘤细胞进行治疗，其本身对于这些细胞凋亡只起很小的作用。X 射线治疗也只有很小的作用，而纵坐标显示，这两种方法联用对于诱导凋亡具有协同增效作用。(C) 这里显示的是赫赛汀和放射线的协同增效作用，与没有用抗体治疗的肿瘤细胞相比，用抗体治疗后的肿瘤细胞对放射线治疗具有相当高的敏感性。这里显示的放射治疗的剂量是用格雷 (Gy) 为单位的 (注意纵坐标是用对数表示的)。(From K. Liang, Y. Lu, W. Jin et al., Mol. Cancer Ther. 2: 1113 - 1120, 2003.)

信息栏 15.4 赫赛汀是首个临床有效的抗受体抗体 EGF 的受体 (EGF-R; HER1) 似乎在 1/3 的人类肉瘤和几乎一半的神经母细胞瘤中过度表达。而 HER2 的过度表达似乎为肿瘤细胞提供促有丝分裂和抗凋亡的信号传递过程中起着关键的作用。而且，因为 HER2 和 EGF-R 异源性二聚体化，后者在促进过度表达 HER2 的乳腺癌细胞的增殖中可能发挥着关键的作用。

由于许多历史原因，抗 EGF-R 的单克隆抗体，著名的 Erbitux (也被称为 cetuximab) 研制比赫赛汀的研制推迟了大约 3 年。2004 年美国食品和药品安全监督委员会 (FDA) 已经批准其用于临床上治疗晚期结直肠癌。长期以来，Erbitux 抗体比赫赛汀具有更广泛的用途，主要是因为 EGF-R 似乎比 HER2 参与更多肿瘤的发病机制。

如图 15.38 所示，Erbitux 的功能明显与赫赛汀不同，因为它可以通过阻断 EGF、TGF-α、amphiregulin 和其他 EGF-R 配体的结合而抑制受体的活性。第三个抗体，称为 Omnitarg 或是 pertuzumab，其作用于 HER2，阻止其与 EGF-R 家族中其他成员异源性二聚体化。

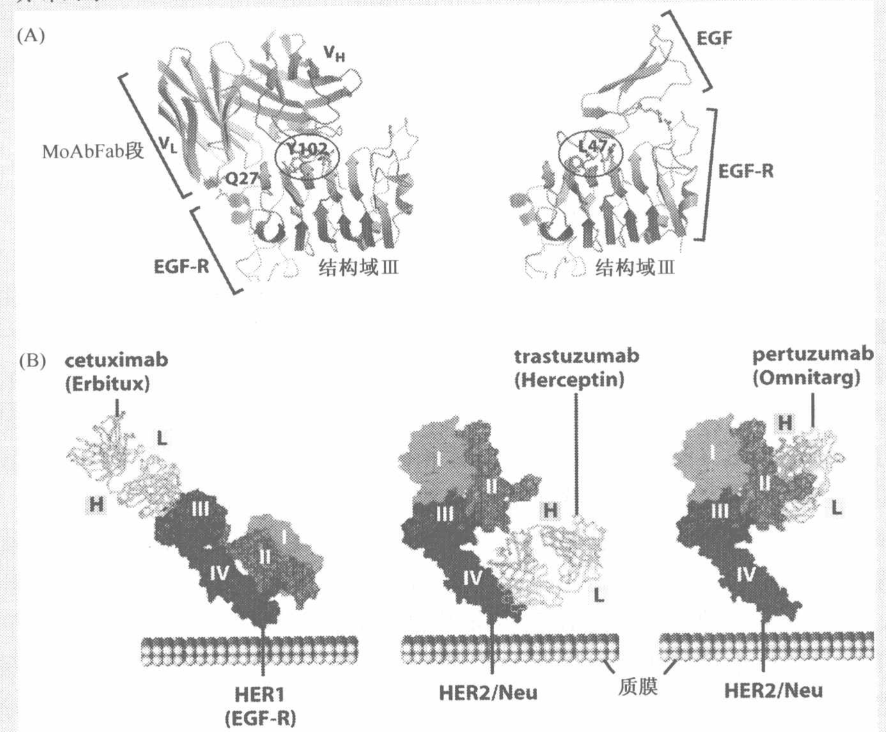


图 15.38　单克隆抗体通过多种机制抑制受体　(A) 与其他的抗受体抗体不同的是，Erbitux（Fab，黄，橙，左图）结合 EGF 受体的区域同样也能被 EGF 配体所结合（圈状区域）（碧绿，右图），因此可以阻断配体激活受体的过程（这一单克隆抗体与 EGF-R 结合的紧密性是 EGF 配体与其结合的 50 倍）。抗体分子中重链和轻链的抗原结合域分别用 V_L 和 V_H 标记。抗体中称为 Fab 片段的部分（包括抗原结合域）被这种 X 射线晶体衍射学所研究分析。(B) 从侧面和更远的距离观察三种截然不同的抗体受体复合物时，就会清楚地发现这些抗体是通过完全不同的方式与受体作用的。如 A 图那样，多种抗受体的单克隆抗体的重链（碧绿）和轻链（黄）上特异的结合位点均被 X 射线晶体衍射学描绘作图。Erbitux（左图），其结合在 EGF-R/HER1 的子域 III 上，已经在 A 图中被详细的描绘了，可以看出其封闭了 EGF 配体的结合位点（与图 5.16C 对比）。相反，赫赛汀（中图）结合 HFR2/Neu 受体，在某种程度上允许后者继续与 HER 受体家族中的其他成员同源或异源二聚体化（HER1、HER2、HER3、HER4；也可以见图 15.34B），而第三种抗体，称为 Omnitarg 或 pertuzumab（右图），结合在对二聚化发挥关键作用的 HER2 子域Ⅱ向右的指状区域，因此阻断了 HER2 与其他相关受体的异源性二聚体化（如 Herceptin 那样，Omnitarg 也能触发抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用）。（A，from S. Li，K. R. Schmitz，P. D. Jeffrey et al.，Cancer Cell 7：301-311，2005；B，from S. R. Hubbard，Cancer Cell 7：287-288，2005.）

这些众多抗受体的抗体比那些低分子质量的药物在抑制受体信号传递方面具有更高的特异性，因为它们不太可能直接影响无关受体的酪氨酸激酶（RTK）的活性。但是，它们也许不能像低分子质量的酪氨酸激酶抑制物那样能有效地渗入肿瘤间隙中（在第16章中讨论）。更重要的是，许多人类肿瘤表达截短版本的EGF-R，其缺乏胞外区且能被组成性的激活（通过一种不依赖配体的形式）：这些蛋白丢失了可以被抗受体的单克隆抗体识别的抗原决定簇，因此可以逃避这些抗体的抑制作用。

15.20 用抗体进行被动免疫可以治疗B细胞肿瘤

由于观察到许多淋巴瘤均是B细胞来源，且在它们的表面表达高水平的由正常B前体细胞经免疫基因重排和突变产生的（图15.39A）特异性抗体分子，由此产生出一种完全不同的被动免疫抗肿瘤方式。由于这些肿瘤是克隆性产物，形成肿瘤的所有B细胞均表达相同的抗体分子。虽然这些细胞表面的抗体分子中大部分多肽序列是来源于这些分子的恒定区域（因此与其他同类抗体相同），但是抗原结合域中的氨基酸序列却代表了它们各自独特的抗原，这些抗原称为独特型（idiotype）。

因此，可以制造出，特异识别恶性B细胞克隆表面表达的抗体分子的抗独特型抗体。这激发了人类的灵感，制造出抗独特型的抗体分子，并用于治疗B细胞肿瘤。众所周知，已生产了一种对抗表达在患者淋巴瘤细胞表面抗体的鼠源抗独特型单克隆抗体。该单克隆抗体小剂量注射使患有晚期肿瘤和只有非常短生存期的患者长期缓解。运用抗独特型抗体的策略对抗多种B细胞来源的肿瘤，最后使大约50名接受治疗的患者产生多种良性反应。

这一治疗策略之所以具有很强的吸引力是因为它的特异性。因为一种抗独特型抗体仅识别患者的肿瘤细胞，而不能识别患者免疫系统中其他所有B淋巴细胞克隆表达的抗体分子。因此，每一个患者的肿瘤细胞表达一种特异的独特型，因为：①每一种B细胞肿瘤是从一个正常的B细胞发展而来的；②这一正常B细胞存在于正常免疫系统中众多独特B细胞中，每一个细胞表达其各自独特的抗体；③肿瘤细胞克隆的正常前体细胞是通过必要的随机程序从众多正常B细胞中筛选出来的。这表明需要为每一位B细胞肿瘤患者量身定做一种抗独特型单克隆抗体（图15.39B）。这些事实可以帮助解释为什么这一策略得不到经济上的支持，因为给每一个患者的肿瘤特制相应的抗体需要花费巨额的经费。

另一个治疗策略因此被实施：一种结合广泛表达在细胞表面的CD20抗原的单克隆抗体（MoAb）已经被研制。CD20表达在B细胞分化的多种阶段和B细胞来源的肿瘤细胞中（图15.40）。这一单克隆抗体，称为Rituxan或是rituximab。为了减少治疗的患者产生抗Rituxan分子的免疫反应，Rituxan分子被人源化改造。Rituxan分子对于其他肿瘤，如许多非霍奇金淋巴瘤（NHL）治疗有效。非霍奇金淋巴瘤（NHL）是1/5的美国男性和1/6美国女性最常见的肿瘤相关死亡的原因（超过90%的B细胞非霍奇金淋巴瘤表达CD20抗原）。

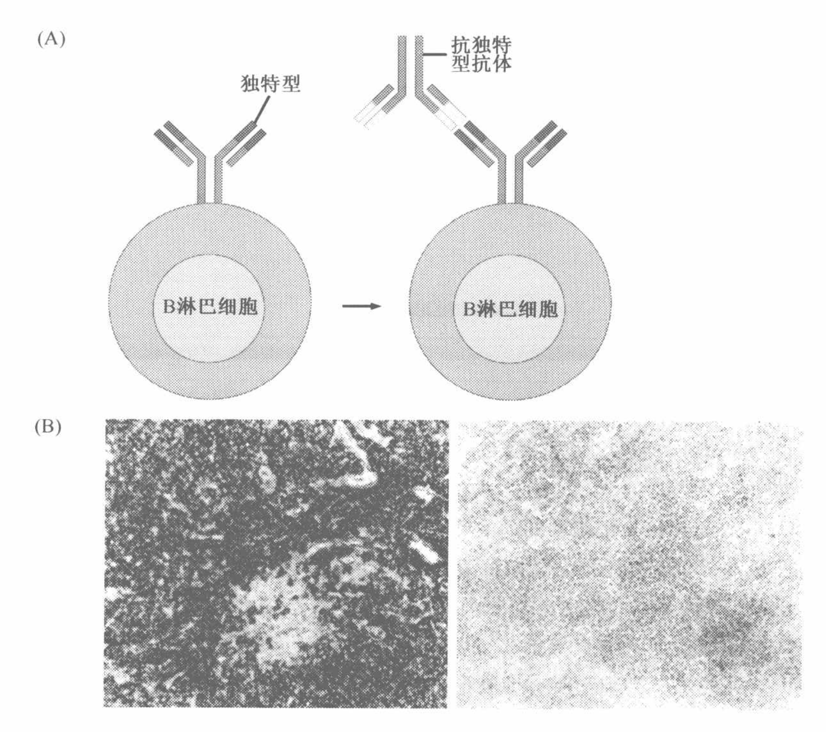


图 15.39 抗独特型治疗 B 细胞淋巴瘤的 (A) B 细胞淋巴瘤来源于 B 细胞，这些 B 细胞已经能产生在可变区有高度特异性抗原结合位点的抗体分子（红）（这些细胞表面表达的免疫球蛋白分子是 IgM 类的，在 B 细胞发育的这个阶段中，其作为一个细胞表面的跨膜分子，因此很像一种生长因子受体）。受体结构样的抗原结合域中的氨基酸序列构成了独特型，其本身也是一种抗原，因此抗独特型单克隆抗体被制造出来，且能够特异性识别 B 细胞表面表达的特殊的 IgM 独特型 。(B) 抗独特型单克隆抗体（MoAb）制造出来是为了治疗一系列淋巴瘤。一个患者淋巴瘤（左图）是被抗肿瘤细胞独特型的 MoAb 显著免疫染色（一个 T 细胞岛处于一个淋巴结中的淋巴瘤细胞团中央，未染色）。相反的是，抗其他 10 种淋巴瘤独特型的单克隆抗体没有在此患者的淋巴瘤上染色，这里有一个图例（右图）。(B, from K. Thielemans, D. G. Maloney, T. Meeker et al., J. Immunol. 133：495-501，1984.）

每周用一定剂量的 Rituxan 治疗复发性滤泡性非霍奇金淋巴瘤患者，大约一半的患者治疗效果明显（如在早期初始治疗成功后复发的肿瘤），或产生难治的肿瘤（对其他治疗方案没有反应的肿瘤）。有趣的是，在治疗的患者中，其正常 B 细胞群也同样可以被这种单克隆治疗杀灭，但仅仅在 6～9 个月后就得以恢复。尽管 rituximab 治疗使正常 B 细胞功能缺失和出现相应的免疫抑制及其他并发的短暂的后果，但这种治疗产生相对较小的副作用，这种反应是可接受的。

截止到 2003 年，Rituxan 已经被用于治疗全世界半数以上患有多种 B 细胞来源恶性肿瘤的患者。在许多情况下，发现其对已经采用的治疗方法有很好的辅助作用。例如，将 Rituxan 加入到治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）标准的化疗方案中，即

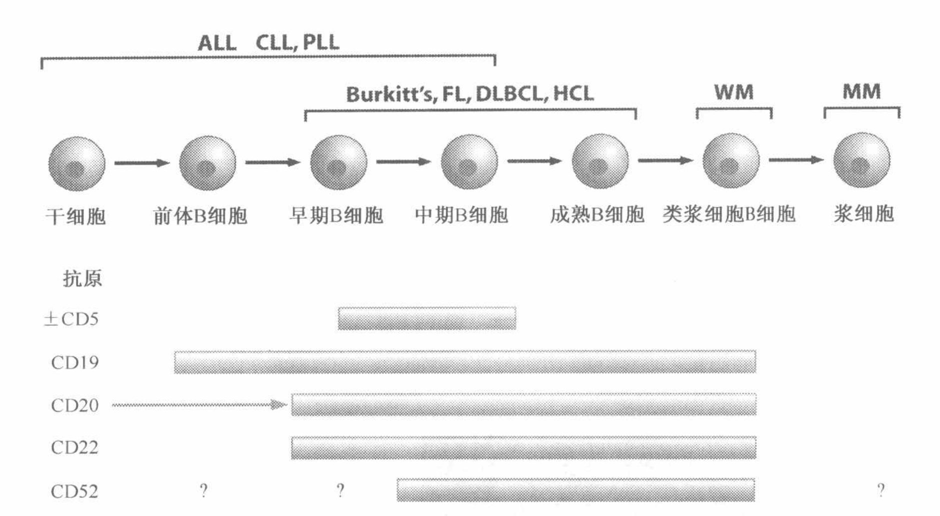


图 15.40 Rituxan 和 B 细胞肿瘤的治疗 Rituxan/rituximab 单克隆抗体的功能部分源于其可以识别 B 细胞在不同分化阶段表达的作为细胞表面跨膜蛋白的 CD20 抗原，这一分化阶段包括从前体 B 细胞开始到形成可以转变成浆细胞的 B 细胞的全过程，而后者是抗体分泌性浆细胞的直接前体。绿条显示 B 细胞表达特征性抗原的不同分化阶段。例如，在前体 B 细胞和所有后来形成的细胞（包括可以转变成浆细胞的 B 细胞）均表达 CD20。如图所显，多种 B 细胞来源的肿瘤，包括 Burkitt 淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤（FL）、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）、毛细胞白血病（HCL）和 Waldenstrem 巨球蛋白血症（WM），其表型上拷贝了 B 细胞在多种不连续分化阶段中显著的特点，即同样也表达这种抗原，这就使 Rituxan 在治疗这些白血病中成为非常有效的手段。值得注意的是，因为骨髓瘤的基因表达模式类似于高度分化的浆细胞，因此大部分多发性骨髓瘤（MM）不再表达 CD20 抗原，这就可以解释为什么 Rituxan 治疗这些肿瘤无效。事实上几个其他的细胞表面抗原（如 CD19）同样广泛的表达，如果是局限表达的，提示抗这种其他抗原的抗体也许某天能被证明具有很好的治疗价值。(Courtesy of R. Levy.)

联合使用四种药物的被称为 CHOP 的化疗方案，可以使疾病进展率或是死亡率下降 41%。一种类似的对治疗滤泡性淋巴瘤的 CHOP 方案进行修改的方法使治疗失败率下降 66%。

因为这一单克隆抗体治疗能稳定病情，因此能延长存活期。事实上它还不能治愈患者，几乎所有患者会在几年内复发。一些复发患者的肿瘤可能对 Rituxan 的第二轮治疗有反应，而其他的也许对 Rituxan 产生抵抗。迄今为止，获得性抵抗的确切机制并没有完全弄清楚：关于 CD20 的表达、抵抗凋亡的能力提高、补体失活和介导细胞毒性的细胞免疫能力的缺失，提出的机制在不断地更新。具有争议的是患者的遗传背景对于 Rituxan 的治疗也有较强的影响（信息栏 15.5）。

信息栏 15.5 遗传因素和非遗传因素决定 Rituxan 治疗效果 之前讨论的，依赖抗体细胞介导的细胞毒（ADCC）杀伤肿瘤靶细胞依赖于细胞毒性细胞的能力，如 NK 细胞，用它们的 Fcγ

受体结合在表面结合有免疫球蛋白γ（IgG 抗体）分子的肿瘤细胞上（见图 15.3 和图 15.36）。人类 NK 细胞上有一种称为 FcγRIIIa 的重要 Fcγ 受体，可以有两种多形态变异体，其第 158 位氨基酸残基可以是缬氨酸（V）或苯丙氨酸（F）。缬氨酸异构体的 FcγRIIIa 对人类 IgG 分子的亲和性高于苯丙氨酸异构体，事实上，在 ADCC 中有缬氨酸异构体的 FcγRIIIa 的细胞毒性细胞远比苯丙氨酸异构体的 FcγRIIIa 的细胞有效得多。人类 NK 细胞表达 Fcγ 受体类型的不同明显影响一个患者对于 Rituxan 治疗的临床反应。所以，在具有 VV 等位基因的纯合子（VV 基因型）的 B 细胞淋巴瘤患者中，用 rituximab 治疗后显示中等的疾病进展时间（从最初的治疗到疾病的复发之间的时间）——534 天，而那些是 FF 等位基因纯合子或是杂合子（VF 或是 FF 基因型）则 170 天就发生疾病的进展。另一种 Fcγ 受体的多形态变异体，称为 FcγRIIa，对于治疗反应也具有较强的影响。因此，除了肿瘤细胞表型的影响，免疫治疗的结果往往受到被治疗的患者基因组成的强烈影响，在上述情况中，一个基因决定着一个 Fc 受体的结构。

但是其他因素也可以预测患者是否或如何对 Rituxan 治疗起反应。例如，当测量治疗患者中 Rituxan 的血清学水平时，那些在较长时间中保持较高水平的患者表现出更为乐观的临床反应（图 15.41）。这就说明了单克隆抗体治疗的一个关键的局限性和一个在免疫治疗发展中未解决的问题：对于决定循环中单克隆抗体的寿命的生物学机制，我们仍不清楚。

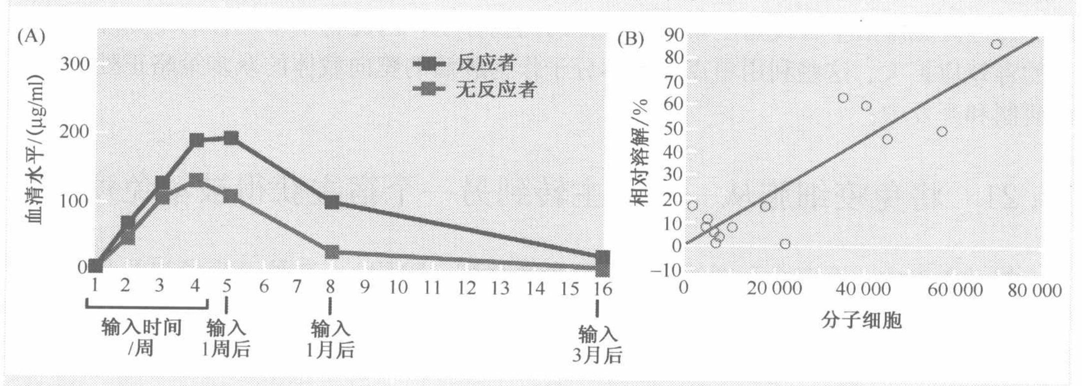


图 15.41　Rituxan 治疗成功的决定因素　（A）一种治疗药物在循环中持续的时间，即它的药物动力学常数（PK），常常决定着它的治疗效果。如图所示，在一组白血病和淋巴瘤患者中，将 Rituxan 每隔四周注射一次，血清中的 Rituxan 水平在这一次和接下来的三个月中被跟踪测定。在那些对这种单克隆抗体治疗产生和没有产生明显临床反应的患者中，Rituxan 的药物代谢动力学常数明显不同。这一现象表明患者中存在某些能结合可利用 Rituxan 的"抗原库"，因此加快 Rituxan 在循环中的清除，抵消其治疗的效果。（B）其他决定 Rituxan 治疗成功与否的重要因素似乎是众多肿瘤表达 CD20 的水平（见图 15.40）。通过测定 14 例收集的新鲜分离的白血病标本可以得到细胞表面表达 CD20 的水平（前淋巴细胞和慢性淋巴细胞性白血病，都是 B 细胞来源的）。如图所示，当 Rituxan 和补体存在时，这些众多的肿瘤对于前两者的溶细胞作用易感性差别很大，其易感性取决于每一种肿瘤标本表达 CD20 分子的水平。（A，from N. L. Berinstein，A. J. Grillo-Lopez，C. A. White et al.，Ann. Oncol. 9：995-1001，1998；B，from J. Golay，M. Lazzari，V. Facchinetti et al.，Blood 98：3383-3389，2001.）

Rituxan 和 Herceptin 两者已广泛用于临床，是大量处于研制和开发治疗性抗体的先锋（见图 15.38）。一般来说，使用 Herceptin 或是 Rituxan，能够成功将患者的存活期延长几个月，偶尔可以延长几年。这一事实与迅速积累的临床结果表明，当与其他的抗肿瘤治疗联合时，这种单克隆抗体治疗是最有效的。两种疗法在持续性缓解中发挥着

高效的协同作用，很可能在未来治愈肿瘤。

对于抗肿瘤单克隆抗体的研究也可以从另一个方向进行：许多实验已经在探究增强这些抗体分子的细胞毒效应的可能性，即抗体分子可能会结合在肿瘤细胞的表面，通过与 Fc 受体结合的补体或是细胞毒性细胞作用引起随后的细胞杀伤。一个有前景的改造，即是将抗体连接在有毒物质上，制造出免疫毒素，它就像一个“巧妙的导弹”对肿瘤进行靶向攻击，这样它们可以将高浓度的毒素导入靶细胞。例如，抗体分子可以在体外与强毒性的生物学物质，如与蓖麻毒素 A 链或是由假单胞菌产生的毒素结合，然后可以将这些毒素导入肿瘤中。

另一种方法是将连接放射性分子的抗体注射入肿瘤患者体内，希望通过放射线杀伤邻近的肿瘤细胞。这种方法的一种变更，将高度有效的化疗药物分子，如阿霉素，连接在抗体分子上。

第三种策略是，将特异性的酶连接在抗体分子上：这些酶类能将无毒的药物前体活化为有毒性的药物。一旦抗体和相连的活化酶在肿瘤中富集后，就将这些药物前体注射入患者体内，其能被肿瘤邻近区域中的酶激活。这种策略的优势在于酶可以在肿瘤靶细胞的邻近区域激活上百或是上千种有毒性的药物分子，因此将单个结合的单克隆抗体分子的毒效应扩大。这些利用单克隆抗体分子作为肿瘤的靶向载体的众多策略正处于积极的研制和开发中。

15.21 将免疫细胞从一个宿主转到另一个宿主获得被动免疫

被动免疫中一个完全不同的类型就是骨髓移植（BMT）。这种治疗最初的基本原理是来自于发现通过药物治疗或是 X 射线照射后，小鼠或人的免疫系统会崩溃。随后植入供者的骨髓移植物，因为它包含造血干细胞（HSC），可以重建受者的骨髓，再生正常造血功能和免疫功能所需要的所有细胞系。

在许多造血系统恶性肿瘤，特别是淋巴瘤和白血病中，骨髓移植的目的是使机体去除全身各处的肿瘤干细胞，最重要的是去除骨髓中的肿瘤干细胞。根据这一设想，骨髓移植可以阻止肿瘤再生，因为肿瘤干细胞已经从患者的骨髓中去除。

当这种肿瘤干细胞治疗策略第一次被运用时，最有效的骨髓供者被认为是与那些骨髓受者组织相容性抗原最匹配的人。这可以保证最有效的骨髓重建和来源于移植物的免疫细胞攻击宿主组织的可能性最小化。但是，随着时间的推移，我们发现供者和受者之间只要具有最低水平的组织相容性就可以了。

骨髓移植在治疗造血系统恶性肿瘤中，大部分的治疗功效是来源于移植物抗肿瘤反应（GvT），即供者的免疫细胞识别和攻击剩余的肿瘤细胞，这些肿瘤细胞是在用放射线照射和化疗方法使患者的骨髓崩溃后残余下来的。这一攻击大概是被激发的，因为受者的肿瘤细胞表达的抗原对于供者的移植免疫细胞来说是陌生的。目前，这种移植物抗肿瘤反应是对慢性粒细胞白血病（CML）实现持久性治愈的唯一真正有效的机制（因为某些不清楚的原因，移植物抗肿瘤反应通常不与相应程度的移植物抗宿主的攻击同时发生，如果真的发生，会导致广泛的炎症，移植的免疫细胞会破坏受者多种正常组织）。

因此，我们再一次看到一个例子，即肿瘤患者在自身免疫系统无能的情况下，通过导入外来的免疫系统产物，实现一个有效的抗肿瘤反应。在这种情况下免疫细胞通常能对患者的肿瘤细胞进行有力的攻击。遗憾的是，由于多种原因，骨髓移植没能被证实是一种治疗实体瘤的（而不是造血系统肿瘤）有效方法。

15.22 动员患者的免疫系统攻击他们的肿瘤

另一主要大类的肿瘤免疫治疗是依靠动员和增强肿瘤患者自身的免疫防御。支持这些方法的观点是患者的免疫系统本身能够攻击和消灭肿瘤，而进攻性的抗肿瘤免疫反应可以通过增加多种细胞毒性免疫细胞的数量和活性来启动。

（这些策略通常被认为是抗肿瘤疫苗中较为新颖的方法。其实这种说法是不准确的，因为传统上疫苗是一种用于预防疾病而不是治疗已有疾病的物质。这就解释了为什么许多听到这种说法的人会认为研制中的免疫治疗将会用于预防肿瘤——这是一个离现在从事研制抗肿瘤治疗人员的想法还非常遥远的目标）。

正在进行的新的免疫治疗方案的大规模开发很大程度上依赖于我们在分子和细胞水平上对免疫功能日益增加的认识。许多方案要求我们不断拓宽对免疫系统中信号调控分子的认识。奇怪的是，免疫动员的一个非常成功的例子是多年来成功用于治疗早期膀胱癌，但它是如何起作用的却一直不清楚（信息栏 15.6）。

信息栏 15.6　细菌可用于治疗膀胱癌　用细菌治疗肿瘤要追溯到 19 世纪末。William Coley，一个纽约的外科大夫，注意到患有细菌性皮肤感染（或曾经患过后来治愈）患者的肿瘤常常会缩小。这就导致了一个研究计划的产生。采用活的或是灭活的细菌作为抗原刺激免疫反应，以抵抗存在于机体中的细菌本身和肿瘤细胞。这一计划历经数十年。这些尝试因为 BCG 的出现而获得了成功，BCG 是一种分枝杆菌的减毒品种。其最初是作为一种抗结核的疫苗而被研制出来的。

BCG 频繁的注入早期膀胱癌患者的膀胱中。这种疗法能有效地削弱或是延迟肿瘤的进展，且通常比外科手术或放射线照射具有更小的创伤性（图 15.42）。BCG 疗法是通过吸引多种免疫细胞（包括 $CD4^+$ T_H和 $CD8^+$ Tc 淋巴细胞）、巨噬细胞、NK 细胞进入膀胱而发挥显著疗效的。在膀胱中这些细胞发生局限性的炎症反应。但是，BCG 抗肿瘤的具体机制仍然不清楚。

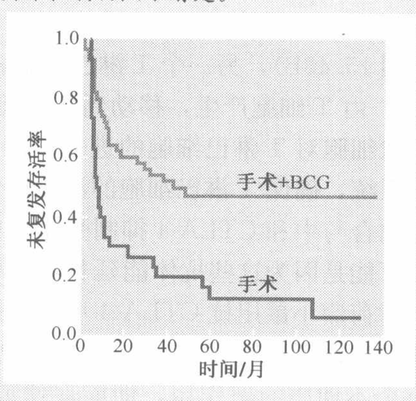


图 15.42　BCG 对于免疫应答的增强作用　BCG 是一种减毒的分枝杆菌，其可以作为一种免疫刺激物使用，在阻止人类膀胱癌进展中发挥明显的作用。在那些仅用 Known 术式进行经尿道切除术外科治疗后（红线），没有复发的患者比例（纵坐标）在治疗后数月中（横坐标）快速下降，如同 KaDlan-Meier 坐标显示的那样。相比之下，在外科治疗后的患者膀胱中再注射 BCG（蓝线），复发的概率要少得多，有些人在 5 年中都没有复发。(From J. Patard, S. Moudouni, F Saint et al., Urol. 58：551-556，2001.)

动员抗肿瘤反应的重要策略是依赖于树突状细胞的激活（15.2 节）。这些抗原呈递

细胞（APC）通常内吞遍布全身组织的感染原或其他抗原颗粒（包括肿瘤细胞），然后迅速回到邻近的引流淋巴结，在那里它们用其 MHC II 类分子呈递消化后的寡肽片段给辅助性 T 细胞（见图 15.8）。树突状细胞可以由一种称为 GM-CSF（粒细胞巨噬细胞集落刺激因子）的生长因子功能性的激活。

综合考虑上述机制后，一些研究者在体外培养患者的肿瘤细胞，并通过输入一种表达载体使这些细胞表达 GM-CSF。然后将这种被改造的细胞再输入患者体内，希望它们能吸引和激活正好经过的树突状细胞。理想情况下，这些激活的树突状细胞会迅速回到区域性淋巴结，激活能启动有效抗肿瘤免疫反应的辅助性 T 细胞。

而另一个策略则是，从血液中收集树突状细胞的前体，通过和一些生长因子特别是 GM-CSF、TNF（肿瘤坏死因子）和 IL-4（白细胞介素-4）混合培育，可以使其分化成功能性树突状细胞。这样做的目的是在体外将大量这样的树突状细胞和肿瘤碎片混合培养，然后将这些树突状细胞输入肿瘤患者的循环系统中，希望它们可以回到淋巴结中，将其获得的肿瘤抗原呈递给辅助性 T 细胞，通过这种方式激活有效的抗肿瘤免疫反应。

一种更直接的策略就是使患者的树突状细胞表达和加工肿瘤相关抗原蛋白。这是希望这些树突状细胞输入肿瘤患者体内后，可以激活患者的 T_H 和 Tc 淋巴细胞，因此可以直接激活抗肿瘤的免疫反应。为了实现这些目标而开发了多种实验性方案。这些方案包括将肿瘤细胞的 mRNA 转染到树突状细胞，以及使树突状细胞接触特定的肿瘤蛋白或是抗原肽、来自肿瘤细胞的凋亡小体、肿瘤细胞溶解物，甚至是照射后的肿瘤细胞群。在一些患者中，运用这些策略能显著地延长晚期肿瘤患者的生存期，尤其是晚期（IV 期）黑色素瘤患者的生存期。未来肿瘤免疫治疗方案的成功率会因为使用成熟的树突状细胞得到巨大的提高，而不是像现在这样，大多数临床试验采用的是未成熟树突状细胞。

T 淋巴细胞尤其是 T_H 和 Tc 细胞，对由抗原呈递细胞（APC）呈递的寡肽的反应可以通过多种途径增强。具体地说，这些 T 淋巴细胞对由树突状细胞呈递的抗原的反应通常经历两个阶段。

在第一个阶段中（图 15.43A），T 淋巴细胞最初与 APC 相遇，可以导致多种淋巴细胞反应，这些反应是由 T 淋巴细胞表面的 CD28 受体介导的。CD28 参与呈递的抗原结合到 T 细胞受体（TCR）上的过程，而 TCR 参与抗原的识别。随后，在第二个阶段中（图 15.43B），另一个 T 淋巴细胞表面受体，称为 CTLA-4（细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4），由 T 细胞产生，移动到 T 细胞受体附近（图 15.43C），强力地抑制抗原呈递的树突状细胞对 T 淋巴细胞的进一步激活。因此 CTLA-4 受体控制着一个关键的负反馈调节系统，确保 T 淋巴细胞的活化仅仅是短暂的，以及限制随后的免疫反应。

结合与中和 CTLA-4 抑制受体的单克隆抗体，能极大地增强 T 淋巴细胞的免疫反应。可能是因为这些抗体能延长和增强抗原呈递的树突状细胞对于淋巴细胞的刺激活化。对荷瘤小鼠用抗 CTLA-4 单克隆抗体治疗后，可以强烈地刺激抗肿瘤的免疫反应。一些肿瘤在这种情况下衰退，而另一些肿瘤却进展（图 15.43D）。但是抗 CTLA-4 抗体有个不期望的副作用，即能促使或加剧人类和小鼠的自身免疫反应。这一迹象表明，这种特殊的信号传递系统是免疫系统用于阻止对正常组织不被破坏的最主要的机制之一。

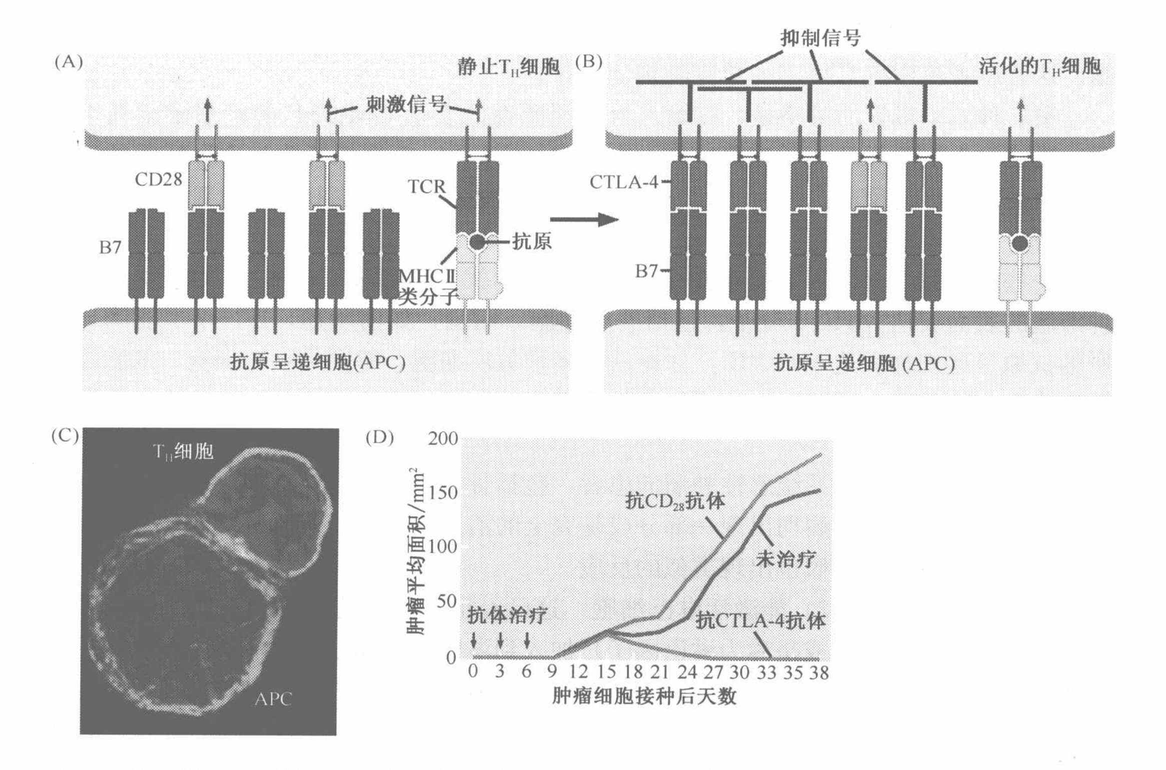


图 15.43 CTLA-4 调节细胞免疫反应 T_H淋巴细胞（上）与抗原呈递细胞（APC，下）如树突状细胞之间的相互作用，包括两个步骤。(A) 首先，T_H淋巴细胞表面表达的 CD28 蛋白（浅绿）与抗原呈递细胞表面的 B7 蛋白（深绿）互补并结合，这使得 CD28 分子释放共刺激信号（红色箭头），其与结合在抗原上的 T 细胞受体释放的信号（蓝色箭头）共同作用使T_H淋巴细胞活化。(B) 在第二个阶段中，作为其活化程序的一部分，T 细胞开始合成 CTLA-4 分子（粉红）。这些 CTLA-4 分子结合在 APC 的 B7 分子上，其亲合力高于 CD28 分子。因此，可以取代 CD28 的结合，继而限制 T 细胞的进一步活化（“B7”包括两种类似的作用分子，称为 B7-1 和 B7-2）。(C) 如图所示，当 APC 和 T 淋巴细胞相互作用时，CTLA-4（红橙）分子会富集在两者之间的突触面上。(D) 调节 CTLA-4 的活性对于抗移植性肿瘤的免疫反应具有较大的作用。如果任一调节环节缺失，就会使肿瘤细胞在注入宿主小鼠 9 天后，开始旺盛的生长（红线）。抗 CD28 血清，可以干预 APC 对 T 淋巴细胞的激活（见 A 图），它在增强这些肿瘤的生长中发挥着很小的作用（蓝线对红线）。但是当荷瘤小鼠在如图所示的时间注射抗 CTLA-4 抗体后，正常发生的 T 淋巴细胞功能的关闭被阻断，并产生高度活化的 T 淋巴细胞杀灭肿瘤细胞（绿线）。这就提出了肿瘤免疫治疗的一种策略，即通过使用抗 CTLA-4 抗体抑制 CTLA-4 的功能。(A and B, from C. A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science, 2005; C, courtesy of J. P. Allison; D, from D. R. Leach, M. F. Krummel and J. P. Allison, Science 271: 1734-1736, 1996.)

在晚期黑色素瘤和卵巢瘤的患者中，所进行的最初临床实验表明通过注射抗 CTLA-4 单克隆抗体 MDX-010，可以增强几种抗肿瘤免疫治疗的有效性，而没有伴随严重的自身免疫反应。那些之前没有经过任何免疫治疗的患者可以进行抗 CTLA-4 单克隆抗体的治疗。而在其他情况下，患者的抗肿瘤免疫反应首先可以通过下列方法进行激活：①接种前面列举的纯化的黑色素瘤相关抗原；②注射自体肿瘤细胞（即他们自身的），这些细胞在体外被改造为表达 GM-CSF 并且被照射（避免被注回患

者体内的这些细胞增殖)。如前所述，GM-CSF 的表达可以吸引树突状细胞到达肿瘤细胞。这些患者再用抗 CTLA-4 单克隆抗体治疗。

第二种效果最好的策略是，在输入自体同源性的表达 GM-CSF 的肿瘤细胞几个月后，再注射入抗 CTLA-4 单克隆抗体。在最初的实验中，5 个患者均对这种特殊的治疗方案表现出明显的反应。因为他们的肿瘤出现区域性坏死，肿瘤相关的血管也出现广泛的损害。

一些肿瘤患者可以用干扰素进行治疗。三种干扰素 IFN-α、-β 和 -γ 均能诱导许多种细胞的表面表达 MHC I 分子，包括肿瘤细胞。而且，如前所述，IFN-γ 也能诱导专职的抗原呈递细胞表达 MHC II，并能动员多种免疫细胞，特别是巨噬细胞、细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。因此干扰素能阻断肿瘤细胞抑制其本身 MHC I 类分子的表达以逃避免疫监视的趋势。

事实上，许多造血系统恶性肿瘤的患者，包括骨髓瘤、淋巴瘤和白血病，在接受多种干扰素治疗后，其肿瘤均出现一部分或是完全的消退。同样，一些黑色素瘤、Kaposi 肉瘤、乳腺和肾脏的肿瘤也出现类似的反应。

白细胞介素-2 (IL-2) 能激活淋巴细胞，这已经证实的功能可以被开发利用，即在体外将这种细胞因子（或是称为淋巴因子）加入到淋巴细胞和已被灭活的肿瘤细胞的混合体中。这会导致淋巴细胞功能性的激活和增强对荷瘤小鼠体内肿瘤细胞的杀伤。这些淋巴因子激活的杀伤细胞（LAK）几乎主要是 NK 细胞，如同我们了解的那样，它能特异性杀伤表面缺乏正常数量的 MHC I 分子和表达特定的应激转化相关蛋白的靶细胞(图 15.29 和图 15.30)。在一些临床试验中，将这些 LAK 细胞和 IL-2 一起注入患者体内。在一个详细记录的试验中，222 个肿瘤患者中的 16 个患者出现肿瘤的完全消退。但是，IL-2 不期望的副作用阻碍了使其成为肿瘤临床常规治疗策略的进一步发展。

一个涉及制备存在于患者肿瘤中的淋巴细胞的相关策略是，在体外将这些细胞进行处理，然后再回输患者体内——这一过程叫做过继细胞输入（ACT）。来自手术切除的肿瘤标本中的大部分肿瘤浸润淋巴细胞（TIL，见图 15.21）再一次表明是 NK 细胞。但是，这些肿瘤浸润淋巴细胞中具有关键功能的亚细胞群是细胞毒性 T 淋巴细胞，其对肿瘤细胞表面表达的抗原具有特异的反应性。重要的是，当这些“受诱导的”细胞毒性 T 细胞在体外被功能性激活后，只需激活更多数量的 NK 细胞所需 IL-2 浓度的百分之一便能被激活。当将这些肿瘤浸润的细胞毒性 T 淋巴细胞注射入患者体内后（通过在体外长期的增殖来增加它们的数量之后），有大约 1/4 的黑色素瘤和肾脏肿瘤的患者出现肿瘤部分回缩。迄今为止，试图从其他种类的肿瘤得到具有特异抗肿瘤的细胞毒性 TIL 的尝试还没有取得能与之相比的成功。

上述 TIL 治疗产生短期反应，部分可解释为输入的 TIL 不能在治疗患者体内稳定存在。因此，研究者试图通过化疗后给黑色素瘤患者注射体外扩增的 TIL 来稳定和扩增体内抗肿瘤的淋巴细胞群（图 15.44A)。在这种情况下，化疗的目的不是杀伤肿瘤细胞，而是用于减少患者骨髓中淋巴细胞和淋巴细胞前体的数量，为接下来注入的 TIL 克隆“腾出空间”。继而后者可以在患者的骨髓中定居下来，能够在免疫治疗过程中在患者体内继续存活甚至增殖。在一些患者中，输入的抗肿瘤的 CTL 克隆细胞群最后占患者免疫系统中细胞毒性 T 细胞的绝大部分。这些细胞毒性 T 细胞在体内的生长是由

注射入患者体内的白细胞介素-2（IL-2）来维持的，其对于患者体内的黑色素瘤细胞具有很高的杀伤力。在几个这样的患者中观察到黑色素瘤体明显消退（图 15.44B）。

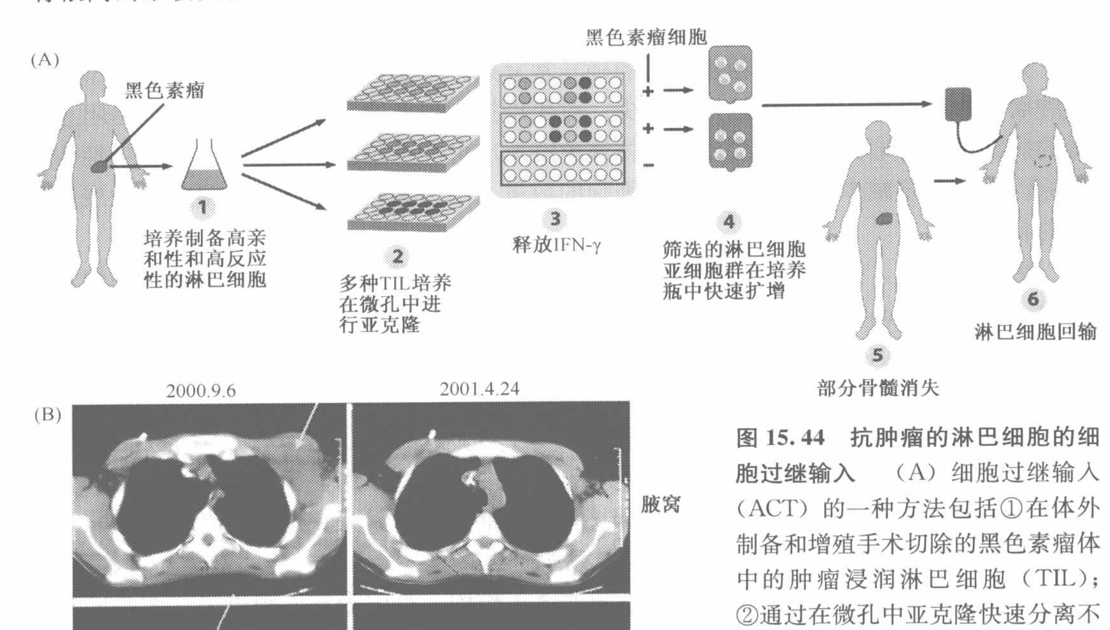


图 15.44　抗肿瘤的淋巴细胞的细胞过继输入　（A）细胞过继输入（ACT）的一种方法包括①在体外制备和增殖手术切除的黑色素瘤体中的肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）；②通过在微孔中亚克隆快速分离不同种类的肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）；③通过与黑色素瘤细胞接触后（橙色孔），鉴定出能产生大量干扰素-γ（IFN-γ）的亚克隆细胞群；④在体外将适当的生长因子、淋巴因子、饲养细胞共同培育使这些细胞大量增殖；⑤用细胞毒制剂处理患者骨髓，以减少但不是完全清除残余淋巴细胞，从而为体外扩增的淋巴细胞创造出一种生物环境；⑥将这种体外增殖的 TIL 来源的淋巴细胞回输患者的体内。这些输入的细胞能在患者的骨髓中稳定存在，并能对肿瘤细胞进行攻击。（B）ACT 的运用有时候会取得显著的疗效。例如，在这个黑色素瘤发生转移的患者中，患者的转移灶（黄色箭头）在腋窝（上）、骨盆（中）、肠系膜淋巴结（与小肠有关，下），通过与 2000 年 9 月 6 日的 CT 扫描图像（左图）分析比较，2001 年 4 月 24 日的 CT 图像表明上述淋巴结明显的缩小（右图），这一反应虽然不典型，但是表明肿瘤患者的免疫系统也许有一天可以这样被处理后而得出与之类似的结果。（A，from M. E. Dudley and S. A. Rosenberg，Nat. Rev. Cancer 3：666-675，2003；B，from S. A. Rosenberg and M. E. Dudley，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101：14639-14645，2004.）

这些反应是令人鼓舞的，但仅仅只是零散的。此类免疫治疗方案中没有一种可以达到如下的效果，即可以重复的使较大比例的治疗患者对其产生强烈的治疗反应。很明显，我们似乎刚刚开始了解如何调控肿瘤患者的免疫系统才能使肿瘤衰退。这也解释了为什么这里介绍的方案仅仅是序幕，它们将很快被那些更能有效激活抗肿瘤免疫反应的方案所取代。

15.23 总结与展望

免疫系统和肿瘤之间的相互作用的确非常复杂，对于免疫细胞在抑制许多类型的人类肿瘤中所起的确切作用仍然知之甚少。对免疫抑制患者的研究表明免疫监视是阻止大量的病毒诱导肿瘤出现的重要原因。体液免疫反应可能是阻止病毒在组织间感染性传播的原因，因此要减少这些病毒侵袭的细胞的数量，因为某些这样的细胞最终会发展成致瘤的状态。

更重要的是，病毒转化的肿瘤细胞持续性表达病毒蛋白，能产生明显被识别的外来抗原，从而激发高效的免疫攻击。这种免疫攻击大部分是被细胞免疫所调控的。当肿瘤细胞的 MHC I 蛋白呈递抗原性病毒寡肽时，可以吸引细胞毒性 T 细胞的注意，这些 T 细胞可以杀灭病毒感染或是病毒转化的细胞。

免疫反应可以抵抗许多非病毒来源的肿瘤以此来保护机体，这一作用机制仍然不明。对于免疫监视在消灭或延迟这些肿瘤的形成中所起的作用，衡量起来是很难的。对免疫缺陷患者的研究可以衡量出这些机制的一些重要性。因为在这些患者中一些非病毒来源的实体瘤的发生率比一般人群高 2～3 倍。

一些肿瘤细胞能成功地逃避免疫系统的杀灭作用，是因为它们很少呈递明显的外来抗原，因此它们得益于正常的免疫系统对“自身”蛋白的耐受。但是其他肿瘤细胞也许会表达这些蛋白质，而且以异常数量或异位表达这些潜在抗原。这些异常表达可能会引起免疫监视系统警惕，继而会开始穷追猛打和杀灭这些肿瘤细胞。

一旦被攻击，肿瘤细胞常常使用各种对策来保护自己。它们会下调最初引起免疫系统注意的抗原表达，通常用相同的机制——使启动子甲基化，这是它们用来去除自身不必要的肿瘤抑制基因活性的策略。另外，它们可能抑制 MHC I 类分子的表达，因为 MHC I 类分子可以使免疫系统监测到肿瘤细胞表面抗原的存在。肿瘤细胞通过机体的组织和循环移动处于一种危险的路径，它通常被位于沿途的免疫细胞阻截，但转移细胞常缺乏 MHC I 类分子事实增加了对免疫细胞阻截的疑惑。

仅有这些免疫逃避的机制是不够的，肿瘤细胞还可能通过驱逐或杀灭潜在的攻击者而发挥更有效的保护作用。例如，释放有效的促凋亡分子如 TGF-β 和 FasL 常常能保证杀灭任一与肿瘤细胞靠近的免疫细胞。

最后，由肿瘤建立的最有效的防御来自于机体的主要细胞系统，该系统是为了建立和维持免疫耐受机制，通常用于防止产生针对的机体自身组织免疫攻击。对于许多抗原的耐受似乎依赖于调节性 T 细胞的作用，后者能保证免疫反应中的体液和细胞免疫均不破坏我们正常的组织。人类肿瘤释放趋化因子 CCL22（可以吸引调节性 T 细胞）最终比在这里列举的其他免疫逃逸机制更能使肿瘤受益。

总之，这些已经被证明的肿瘤细胞所采用的策略使我们相信逃避免疫攻击是大部分甚至所有的肿瘤向高度恶性的生长状态转变过程中的一个重要步骤。事实上，免疫逃逸和之前列举的特征（11.18 节）一样是肿瘤的基本特征之一。

之前，我们描述肿瘤进展的每一个步骤，因为其成功地打破了机体细胞和组织中重要的抗肿瘤防御机制。如果真是这样，我们可能会对多种防御机制在阻止肿瘤发生的过

程中所做出的相对贡献产生疑问。大多数这些机制描绘了在我们所有细胞中固有的调节线路作用。在控制个别细胞发展成癌的过程中，有多少抗肿瘤的防御作用归结为这些细胞的自主机制？我们对抗肿瘤的防御有多少来自整个机体和其免疫系统的作用？对这些问题最后的回答仍然难以给出，再过 10 年可能会有答案。

正常免疫系统对防御多数肿瘤的频繁失败不能阻止真正有效的抗肿瘤免疫治疗策略的最终发展。免疫学家正在获得操纵它的能力，并且使用这些成分去攻击癌细胞。当前研究的动员免疫许多策略（表 15.4，图 15.45）中仅有少数在这章中被描述。

迄今为止，已确定了上百种的细胞因子（免疫系统的调节因子包括白细胞介素和干扰素）和它们的同源受体。某些已有功能性的特征，而大部分没有。它们几乎被平均分成增强免疫功能的因子（如干扰素、白细胞介素-2）和抑制免疫功能的因子（如 IL-10、TGF-β）。如此长的细胞因子清单说明免疫调节的复杂性。事实上，我们仅仅开始了解正常免疫功能的生理学和运用它去加强抗肿瘤防御的可能性。事实上，一种非常重要的免疫细胞——调节性 T 细胞（T_{reg}）仅在最近才被研究清楚，这一事实表明免疫学领域不断地在修正许多基础概念。

表 15.4　抗肿瘤免疫治疗策略的例子

被动免疫
注射肿瘤特异的单克隆抗体（如 Herceptin、Rituxan）
移植组织相容的骨髓
主动免疫
注射有活性的肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）
注射载有肿瘤特异寡肽抗原的树突状细胞
将 B7 共刺激的受体加到导入的肿瘤特异性抗原中
封闭 CTLA-4 的功能
抑制调节性 T 细胞

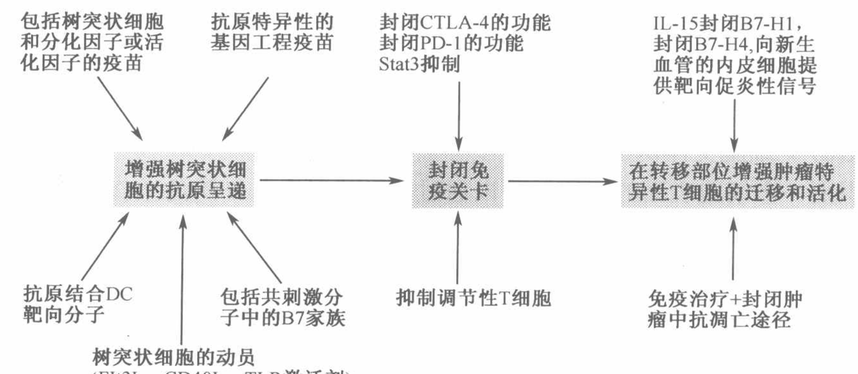


图 15.45　抗肿瘤免疫治疗的策略　为了创造出更有效的抗肿瘤的免疫治疗，一些独特的策略现在已经被运用。如图所示，免疫学功能集中在三个主要的步骤上：增强抗原呈递、抑制免疫学关卡和增加活化 T 细胞向肿瘤迁移的数量。在这幅图中显示的许多策略并没有在这一章中讨论。B7-H1 和 B7-H4，B7-相关蛋白；DC，树突状细胞；Flt3L，Fas 样细胞因子受体的配体；PD-1，CTLA-4 相关蛋白；TLR，toll 样受体。（From D. Pardoll and J. Allison，Nat. Med. 10：887-892，2004.）

目前仍不十分清楚，免疫系统在多步骤肿瘤进展期间如何以及何时对存在的肿瘤细胞首先警觉并企图清除它们，而且通常是不成功的。这种情况可发生于癌细胞侵入基质直接面对免疫细胞时。另一个吸引人的模型，是在肿瘤进展的炎症早期，当巨噬细胞和其他白细胞被最先募集至肿瘤基质时，它们最初相遇的地点仍然没被证实。

至今不可能说正在研究中的免疫治疗策略中的某一种会比现在已经研制的策略更加

有效，并将成为对大部分治疗患者产生更强、更持久疗效的抗肿瘤治疗的先驱。不容乐观的是，肿瘤细胞的变异性和可塑性可能常常使真正的有效免疫治疗发展受阻。或许肿瘤疾病的基本特征妨碍了肿瘤的免疫治疗，它根本不可能被聪明的免疫学家和肿瘤生物学家所克服。在下一章我们将再次斟酌这些问题，本书通篇报道的生物学发现是用于发展新型低分子质量药物来攻克来源不清、不断变化的癌细胞。

重要概念

- 为了破坏和中和已成为靶子的感染病原体或细胞，免疫系统发动两种攻击，包括体液免疫和细胞免疫。
- 某些类型的免疫细胞对理应被清除的细胞具有固有识别能力；巨噬细胞和 NK 细胞是这些细胞类型中最突出的两类。
- T 淋巴细胞通过表达 T 细胞受体才能发挥识别抗原的作用。T 细胞受体是适应性免疫的关键成分，它是通过基因片段重组而产生的，这一过程类似于可溶性抗体的形成。这些 T 淋巴细胞大部分是细胞毒性 T 细胞（CTL 或 Tc's)、辅助性 T 细胞（T_H's）和调节性 T 细胞（T_{reg}）。
- 辅助性 T 细胞辅助 B 细胞产生抗体，因此可以引起体液免疫，以及辅助细胞毒性 T 细胞的成熟和识别理应被清除的细胞。调节性 T 细胞抑制辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的活性。
- 机体中的正常细胞通过 MHC I 类分子定期在细胞表面呈递蛋白质寡肽片段。专职的抗原呈递细胞（如巨噬细胞和树突状细胞）用 MHC II 类分子呈递它们在清除组织环境时所得的蛋白质寡肽片段。这些众多的寡肽片段就是辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的 T 细胞受体识别的抗原。
- 抗体识别一个细胞表面的抗原后可以通过两种机制介导细胞的杀伤：①表达 Fc 受体的细胞，特别是巨噬细胞和 NK 细胞，能识别抗体结合的细胞并将其杀死；②补体可以与结合在细胞表面的抗体结合，通过释放穿孔素将细胞杀死。
- 免疫系统对正常组织抗原和外来成分表达的抗原，特别是对感染性抗原能发挥固有的免疫识别能力。但是免疫系统通过一些特有的机制抑制其各种成分对正常组织抗原的反应性，因此对它们产生了免疫耐受。
- 免疫系统中许多旨在识别和消灭感染性抗原的作用也可能用于对癌细胞的攻击。但是，它的耐受诱导机制也包含在这些攻击中，因为这些肿瘤细胞抗原绝大部分是正常细胞蛋白质的成分。
- 一些肿瘤相关抗原也许能吸引免疫系统注意，因为它们通常仅在胚胎中或是在免疫学中特赦部位表达，如睾丸和大脑中，在这些地方对于细胞的抗原还没有产生免疫耐受。其他肿瘤相关抗原可能激发免疫识别和攻击，因为它们提升了表达水平。
- 免疫缺陷个体提升了多种肿瘤的发病率，这一事实有力地表明免疫系统能持续监视机体组织中出现的肿瘤和试图清除它们，具有免疫监视作用。
- 尽管有免疫监视，一些肿瘤也能在机体中旺盛生长，仅仅是因为这些肿瘤具有弱抗原性。另一些肿瘤本来表达强抗原性，但是产生了弱抗原性的变异体。这是肿瘤细

胞众多免疫逃逸机制的一种。

- 肿瘤细胞表达肿瘤相关抗原（TAA），常常可以反映产生这些肿瘤细胞的组织的分化程度。抑制 TAA 的表达可以使肿瘤细胞逃避免疫监视，同时，肿瘤细胞增殖能力也不受抑制。
- 其他免疫逃逸机制包括一些因子的释放，如 IL-10、FasL 和 TGF-β，这些因子能杀伤与肿瘤细胞靠近的免疫细胞。
- 肿瘤细胞也可能吸引调节性 T 细胞，后者可以使任一进入肿瘤内的细胞毒性 T 细胞失活。
- 因为免疫系统常常不能抑制肿瘤的发展，研究者们设计了许多治疗方法，它可以补充或是增强已有的免疫应答。一个重要的策略是向肿瘤患者提供可以结合在肿瘤细胞上的单克隆抗体，通过多种机制可以杀死肿瘤细胞。其中的单克隆抗体包括 Herceptin 和 Rituxan。
- 另外，一些试图发展的抗肿瘤免疫治疗方案，包括扰乱那些正常调控多种免疫细胞活性的信号传递分子。例如，GM-CSF 能激活树突状细胞，而抗 CTLA-4 抗体能增强抗原呈递细胞和辅助性 T 细胞之间的相互作用。
- 免疫系统对肿瘤的反应仍然不能被很好地理解，多种免疫调节在许多方面为激活抗肿瘤反应创造了机会，但其中大部分尚不能应用于肿瘤的临床治疗。

思考问题

1. 病毒基因怎样帮我们了解肿瘤细胞是如何逃避免疫监视的？
2. 用什么方法才能使肿瘤细胞变的更具免疫原性？
3. 如何测定在对体内的肿瘤进行监视的免疫功能？
4. 如何确定肿瘤相关巨噬细胞是支持肿瘤生长还是作为免疫系统中的成分对肿瘤进行杀伤？
5. 通过哪些途径，癌蛋白使肿瘤细胞更能抵抗免疫系统中多种成分的杀伤？
6. 你认为什么是最令人信服的证据，表明免疫系统在抑制多种常见的实体瘤的出现起着关键的作用？
7. 你是如何评估天然免疫力和适应性免疫力在抑制临床明显肿瘤的出现中相关的重要性？

参考读物

Alegre M-L, Frauwirth KA & Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 220–228.

Bingle L, Brown NJ & Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196, 254–265.

Boye J, Elter T & Engert A (2003) An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann. Oncol.* 14, 520–535.

Cheson BD (2002) Rituximab: clinical development and future directions. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2, 97–110.

Darnell R (2004) Tumor immunity in small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 762–764.

Dillman RO (2001) Monoclonal antibody therapy for lymphoma: an update. *Cancer Pract.* 9, 71–80.

Dranoff G (2002) Tumour immunology: immune recognition and tumor protection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 161–164.

Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 11–22.

Dudley ME & Rosenberg SA (2003) Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 666–675.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.

Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 1–20.

Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ & Melief CJ (2004) Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* 10, 475–480.

Finn OJ (2003) Cancer vaccines: between the idea and reality. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 630–641.

Fishelson Z, Donin N, Zell S et al. (2003) Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* 40, 109–123.

Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD & Gorter A (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 24, 158–164.

Greenwald RJ, Freeman GJ & Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548.

Harris M (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* 5, 292–302.

Houghton AN, Gold JS & Blachere NE (2001) Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 134–140.

Khong HT & Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999–1005.

Korman A, Yellin M & Keler T (2005) Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 6, 582–591.

Lieberman FS & Schold SC (2002) Distant effects of cancer on the nervous system. *Oncology* 16, 1539–1551.

Melief CJM, Van Der Burg Sh, Toes RE et al. (2002) Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 188, 177–182.

Old LJ (2001) Cancer/testis (CT) antigens—a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.* 1, 1.

Old L & Chen Y-T (1998) New paths in human cancer serology. *J. Exp. Med.* 187, 1163–1167.

Pardoll DM (2002) Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 227–238.

Pardoll D (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807–839.

Pardoll D & Allison J (2004) Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat. Med.* 10, 887–892.

Penn I (1994) Depressed immunity and the development of cancer. *Cancer Detect. Prevent.* 18, 241–252.

Rathmell JC & Thompson CB (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 781–828.

Raulet D (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 781–790.

Riddell SR (2001) Progress in cancer vaccines by enhanced self-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8933–8935.

Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing $CD25^{+}CD4^{+}$ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6, 345–352.

Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA et al. (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188, 22–32.

Schwartz RH (2005) Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* 6, 327–330.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancers that overexpress HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792.

Smith MR (2003) Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359–7368.

Smyth MJ, Godfrey DI & Trapani JA (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2, 293–299.

Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K & Yagita H (2002) New aspects of natural-killer cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 850–861.

Turk MJ, Wolchok JD, Guevara-Patino JA et al. (2002) Multiple pathways to tumor immunity and concomitant autoimmunity. *Immunol. Rev.* 188, 122–135.

Wang E, Panelli MC & Marincola FM (2005) Gene profiling of immune responses against tumors. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 423–427.

（张叔人　郭素娟　钟　永　唐翌姝　施桂兰）

第16章　肿瘤的合理治疗

所有的物质都是有毒的，没有毫无毒性的物质。正确的药物剂量决定了它是毒物还是有治疗作用。

Paracelsus (Auroleus Phillipus Theostratus Bombastus von Hohenheim)，
炼丹师和内科大夫，1538年

医生虽然能够开具处方，但对药物的细节知之甚少，对所治疗的疾病也不能完全了如指掌，而对使用药物的人们来说知道的就更少了。

Voltaire (Francois-Marie Arouet)，
作家和哲学家，1760年

本书中描述的研究结果代表了我们认识肿瘤发生过程的一场革命。1975年以前，人们对人体细胞内导致肿瘤表型的分子改变毫无所知。经过一代人的努力，我们获得了这方面的丰富知识。实际上，现有的关于肿瘤起源的信息和概念已经形成了一门学科，这门学科具有完整逻辑性与连贯性的概念结构。

尽管我们对肿瘤的认识已经向前跨进了一大步，但我们探索肿瘤病因学（如肿瘤的病因与机制）并将其应用于肿瘤的预防与治疗这一过程进展缓慢。目前广泛应用的大部分抗肿瘤药是在1975年以前开发的，而那时的药物开发还没有得到肿瘤发生的遗传学和生物化学机制的启发。为此，分子肿瘤学家们由于他们的研究成果没有能在抗肿瘤药物开发中充分发挥作用而感到受到挫败。

让这一挫败感更强烈的是一般实体肿瘤的治疗进展非常缓慢这一事实。例如，1970年，美国肺癌患者5年的生存率为7%，而30年后，这一生存率的数字仅为14%，这只能说是一个微小的进步。即使这一微小的治疗上的进步也是不可靠的，由于现代诊断技术的进步使肿瘤的诊断远早于其临床过程，这实际上使肿瘤诊断与最终进展至疾病末期的时间间隔延长了。由于早期发现并通过外科手术切除了肿瘤赖以生长的早期肿瘤，结肠癌的死亡率已经开始下降（图16.1A；图11.8C）。然而，近几十年来晚期结直肠肿瘤的死亡率几乎没有发生改变——这正好证明了一旦肿瘤发现侵袭并开始转移后用化疗和放疗手段来清除它们是无所作为的（补充材料45◎）。

当然，有关肿瘤发生的分子与细胞机制的丰富信息将对产生有效的肿瘤治疗新方法给予启示。在这一章里，我们介绍了大量的正在开发中或刚刚进入临床的治疗策略。我们的目的并不是对当前这一领域的研究进行全面的调查（这样做是不可能的）：一项2003年的抗肿瘤治疗方法的统计资料表明，由大的制药公司和小的生物技术公司进行的处于临床前期或临床试验阶段的研究和开发项目有1300个之多。目前，正在开发中的治疗药物包括小分子药物、蛋白、抗体和包括病毒载体在内的基因治疗等策略。

我们的目的不是使本书成为一本百科全书，而是聚焦于一些近期发展起来的治疗策略，用它们来说明我们前面章节描述的那些发现如何催生了新的肿瘤治疗策略，分子诊

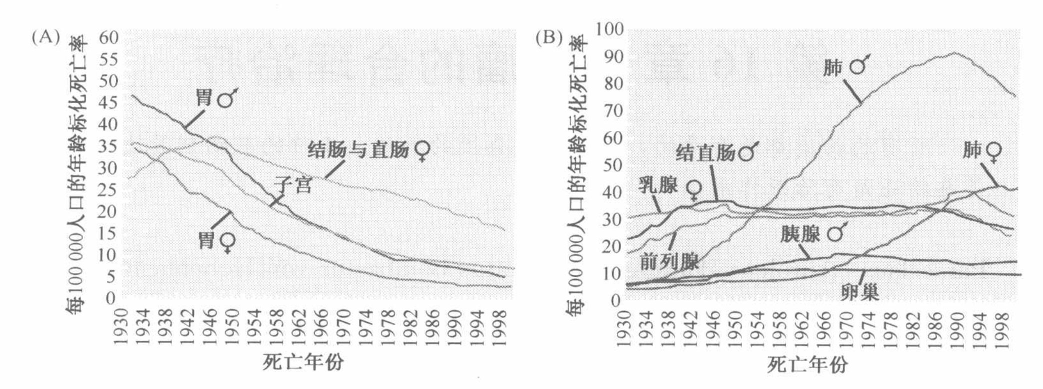


图 16.1　20 世纪 30 年后肿瘤死亡率统计　美国对年龄标化死亡率的统计发现两个长期的趋势。（A）1930 年以来一些主要致死性肿瘤的死亡率明显下降。导致胃癌死亡率下降的原因是食物贮存方法的改变和幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*，H. P.）感染率的下降，而使宫颈癌和结直肠癌死亡率下降的原因则是普查的推行。（B）一些肿瘤相关的死亡数据表明它们对传统化疗是耐受的，尤其是那些已经进展至高度恶性并已有转移的晚期肿瘤。（From A. Jemal, T. Murray, E. Ward et al., CA Cancer J. Clin. 55：10-30，2005.）

断将如何在新治疗策略的发展与临床推广中发挥越来越重要的作用。

同时，我们也不讨论分子生物学如何改变了肿瘤预防的策略。为此本书也不涉及用于预防乙肝病毒（hepatitis B virus，HBV）和人乳头瘤病毒（human papillomavirus，HPV）感染的疫苗的研究进展。这些疫苗将极有效地降低肝癌和宫颈癌的发生率，这些疾病在世界部分地区十分猖獗。如果公共卫生建设的历史表明其有指导意义的话，与本章讨论的治疗方法相比，肿瘤预防最终将使疾病相关死亡率更明显地下降（见补充材料 45）。

本章将主要讨论小分子治疗药物以及它们在细胞内的靶点，这些靶点是通过对肿瘤细胞内信号转导的研究而发现的。这些治疗方法具有广阔的应用前景，但它们真正的治疗潜能也有待于进一步实现。这些药物开发过程中的轶事是非常有趣和令人兴奋的，其中的成功和失败使我们学到了很多东西。值得指出的是许多基于单克隆抗体的治疗方法和一些以预防或阻断肿瘤血管生成的治疗方法已经在前面的章节中进行了讨论，因此这里并没有涉及。许多已经应用了几十年的传统的肿瘤治疗方法也没有在这里进行讨论，因为它们的发展与本书中描述的当前的发现没有太多关系。

几乎本书中讨论的所有的研究成果都要从现在开始经历一代人的时间的检验才能被认为是可靠和正确的（尽管可能并非像预期的那样令人兴奋）。然而，那些喜欢确定性和永恒真理的人可能会发现随后介绍的这些内容并不十分令人满意，原因很简单：这里报道的结果具有很大的波动性，因此会随着时间的推移而改变。

这本书出版 10 年后可能会发现这里的许多治疗方法是十分离奇，甚至是错误的。从认识肿瘤发生的分子机制转化为疾病治疗方法的战役刚刚开始，我们只是刚刚迈出了最初磕磕绊绊的脚步。

16.1 有效治疗方法的发展和临床应用依赖于疾病的准确诊断

在过去的章节中，我们反复地根据组织来源和临床进展分期来对肿瘤进行分类。这些分类几乎总是根据这些正常与恶性组织的显微镜下的表现来进行的。有些时候，为了进一步确定，我们需要通过描述一些分子标志物（如乳腺癌中 HER2 的表达）以及它们对于预后的意义来进一步细化这些分类。但总的来说，与半个多世纪的临床肿瘤学实践中看到的一样，组织病理学是我们讨论中的主要根据。

即使我们对人类肿瘤的分子起源一无所知，人们也越来越清楚地知道传统的肿瘤分类方法具有一定的局限性。真正有用的诊断必须为临床医生提示疾病的潜在性质，更重要的是提示每一疾病亚类对不同治疗方法的反应性如何。随着对人类肿瘤认识的加深，我们逐步认识到传统上划归为一种疾病的人类肿瘤实际上应该被划分为不同的疾病亚类。这将有助于解释为什么过去 30 年中一直使用的抗肿瘤治疗策略的总体治疗成功率如此之低。这些药物反应率对新药的开发也具有重要的提示意义（补充材料 46 ◎）。

对于患有对某一特定治疗方法敏感的肿瘤的患者来说，这一治疗将有极大的益处，包括延长患者生命，甚至一些情况下能够完全治疗肿瘤。对于其他的患者来说，一律给予相同的治疗方法并不能产生显著的临床疗效，这时患者可能接受其他已经证明确实有效的治疗方法。但是更糟糕的是，肿瘤治疗常会发生大量的副作用，一些治疗也会增加多年后第二位点肿瘤的发生率。例如，20 世纪 80 年代早期，接受当时标准剂量环磷酰胺（烷化剂一类的肿瘤化疗药）治疗的乳腺癌患者继发急性髓性白血病的危险性增高了 5.7 倍（目前的治疗方案使用较低剂量，大大降低了这类第二位点肿瘤的发生率）。所有这些事实都表明迫切需要更精细的诊断方法，这种方法能够准确预测对不同抗肿瘤药的反应性，以避免不适合这种治疗的患者使用（补充材料 47 ◎）。

2003 年美国共发现 192 000 例侵袭性乳腺癌和 46 000 例原位乳腺癌。当年预计该肿瘤将吞噬约 40 000 患者生命。对侵袭性乳腺癌的大部分患者都进行了强势的化疗。因为 20 世纪的大部分时间里美国的乳腺癌年龄标准化死亡率并没有显明改变（图 16.2），但在这段时间里化疗方法却发生了巨大的变化。这说明大部分当时诊断的侵袭性乳腺癌（可能大于 3/4）即使不进行治疗干预也不大可能会导致该患者的死亡。这种情况与西方大量确诊的前列腺癌一样，补充材料 47 ◎）。随着乳腺癌筛查的普及和微小的、以前会造成漏诊的

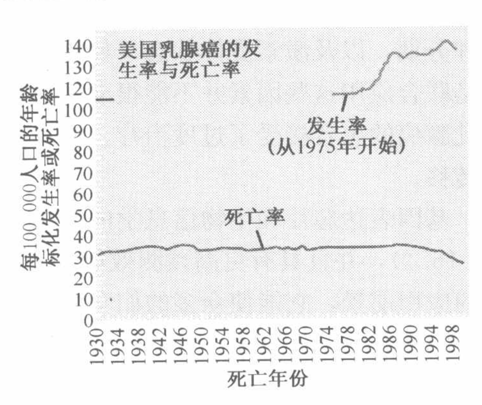


图 16.2 美国乳腺癌发生率与死亡率对比 在过去的几十年中年龄标准化的乳腺癌发生率稳步上升，而这一疾病的死亡率却相当稳定，直到 20 世纪才开始下降。发生率的增加很大程度上是由于普查的推广，只有一小部分的增加是由于生殖方式、营养等改变而导致的真正的疾病发生增加。（From A. Jemal，T. Murray，E. Ward et al.，CA Cancer J. Clin. 55：10-30，2005.）

肿瘤的检测方法的进步（图 16.3），乳腺癌发生率和死亡率之间的差距会逐渐加大。

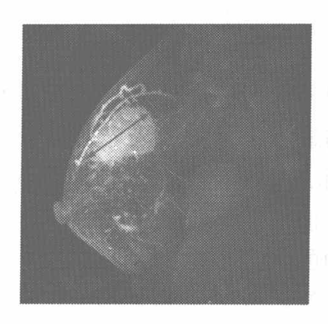
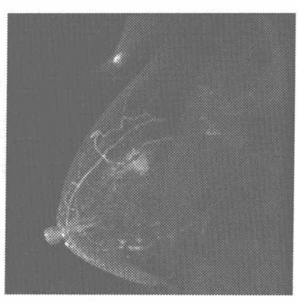



图 16.3　高分辨率、非侵袭性人体组织成像　磁共振成像（MRI）技术的发展使活体组织的非侵入性可视化的分辨率越来越高。现在的 MRI 可以检测到体积非常小的乳腺肿瘤（几个毫米直径）。如图中所示，MRI 可以用来详细观察抗肿瘤治疗的进展（在这一病例中使用的是蒽环类的细胞毒制剂进行化学治疗）。这一高灵敏成像技术的广泛应用可能会使未来的乳腺癌发生率升高。（Courtesy of N. M. Hylton and L. J. Esserman.）

这类的统计结果突出表明迫切需要发展分子标志物以使肿瘤学家能够区分真正需要强势治疗的肿瘤和可被忽略或定期监测症状和进展的肿瘤。对于其他类型的肿瘤，区分对治疗敏感和不敏感的肿瘤同等重要，只是让那些疾病在富于同情心的护理下走完自己的自然历程有些残酷。

图 13.18 首次描述的这类基因表达芯片在使临床医生对肿瘤进行精细分类方面显示出巨大的前景。它可以将肿瘤分成具有不同生物学特性与预后的亚类。这些基因芯片被认为是功能基因组科学中关键的分析工具，它使研究者们能够检测组织样本中 10 000 甚至 20 000 个不同基因的表达水平。随后应用生物信息学对这些表达芯片进行的计算机分析使人们能够从发生表达改变的基因中（特征性的高水平或低水平表达）鉴定出一小部分基因，这些基因的表达水平与某一特定的生物表型、药物反应性、预后相关。例如，某一肿瘤中几十个基因的改变可能足以预测其进展程度或它与另一种肿瘤亚型的关系。

对于乳腺癌患者来说，迫切需要一种能将可发生转移的原发肿瘤与处于休眠期、在患者生存期内不可能会发生扩散的原发肿瘤区别开来的方法。传统上，广泛用于预测肿瘤发展进程的主要预后因素为患者年龄、肿瘤大小、腋窝淋巴结状态、肿瘤组织类型、病理分期，以及激素受体状态（如雌激素与孕激素受体的表达）等。由于无论单独应用还是联合应用这些因素并不能很准确地判断患者的预后，导致美国大部分被诊断为原发性乳腺癌的患者接受了过度治疗。而在这些患者中 15％的患者终生不会出现威胁生命的转移。

基因表达芯片和生物信息学的应用使预测乳腺癌的临床进展的准确性达到了 90％（图 16.4），并且具有更高预测效能的方法正在进展中。这些高度准确预测信息具有广阔的应用前景，它能使众多的妇女免于接受不必要的化学治疗。在不久的将来，基因表达芯片的细致分析可能为肿瘤学家们提供治疗方案，告诉肿瘤学家们哪些方案最可能产生持久的临床反应，甚至治愈肿瘤。

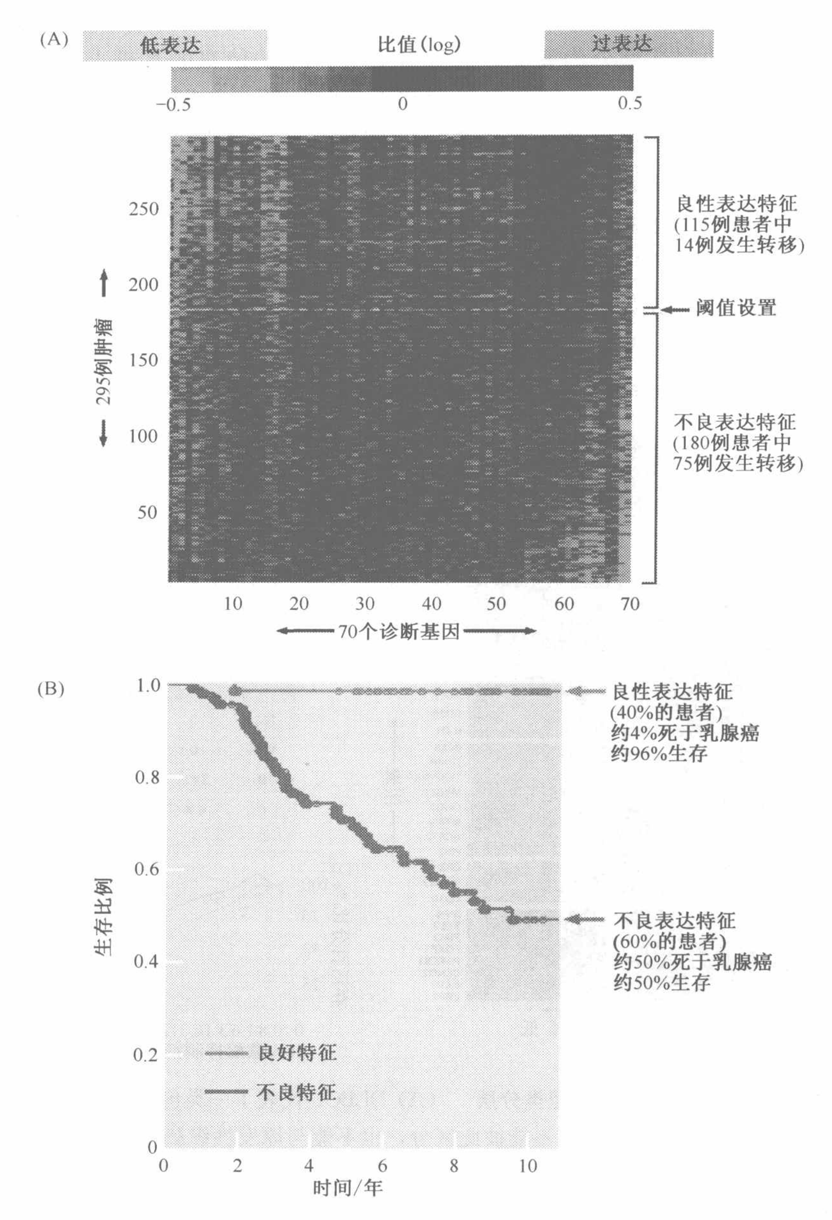


图 16.4 乳腺癌的功能基因组学分层分析 (A)用表达芯片分析 295 例小于 53 岁患者的原发性乳腺癌的基因表达。这一人群中既包括腋窝淋巴结有转移细胞的患者，也包括淋巴结肿瘤细胞阴性的患者。应用生物信息学对这些肿瘤进行分析方法选择了 70 个“有诊断意义的基因”的集合，这些基因的表达能用来对这些乳腺癌患者进行分类（按垂直轴进行排列)。患者的临床过程进行了平均 7 年时间的随访。将选择的 70 个基因的表达水平（按水平轴进行排列，但未给出基因名称）与患者的临床病史相结合，设立了一个阈值，这一阈值能区别具有良好表达特征肿瘤和不良表达特征的肿瘤。(B) 这一 Kaplan-Meier 曲线图显示了 151 例乳腺癌患者的亚类分型。对这些患者的生存状况进行了最初诊断后的 10 年时间的随访。应用图（A）所建立的标准，他们被分成两个具有完全不同临床过程的组别。与其他因素相结合（如化疗疗效）进行计算分析表明，具有良好基因表达特征的肿瘤患者实际上并没有从辅助化疗中受益。(From M. J. van de Vijver，Y. D. He，L. J. Van't Veer et al.，N. Engl. J. Med. 347：1999-2009，2002.)

如图 16.4 显示的分析只是用表达芯片进行大规模分析各种人类肿瘤的开始步骤，可以进一步将不同肿瘤类型分为亚类，并在此芯片产生的信息的基础上为每一特定亚类设计不同的治疗方案。例如，B 细胞淋巴瘤曾由于具有明显不同的临床后果而使肿瘤学家们感到困惑，因为有一些患者会在诊断后四周内死亡，而另外一些患者能够被治愈，或者至少达到 10 年的无临床症状生存。

而所有的这些肿瘤在显微镜下看起来都是相似的（图 16.5A）。然而，基因表达芯片的应用（如下图 16.5A）能将这些肿瘤分为三类明显不同的疾病，这三类疾病具有完全不同的临床后果，即原发性纵膈 B 细胞淋巴瘤（primary mediastinal B-cell lymphoma，PMBL）、生发中心 B 细胞样淋巴瘤（germinal- center B-cell-like，GCB）和致活的 B 细胞样淋巴瘤（activated B-cell-like lymphoma，ABC）（图 16.5）。

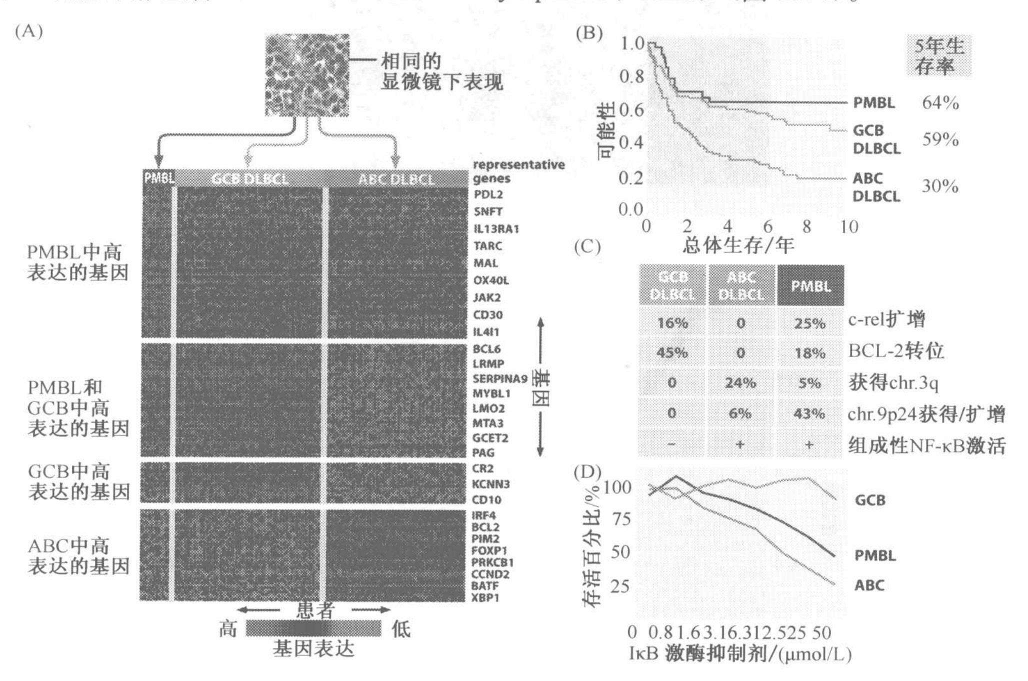


图 16.5　弥散性大 B 细胞淋巴瘤的亚类分层　(A) DLBCL 代表了一类包含几个 B 细胞淋巴瘤亚类的肿瘤集合。这几个亚类在显微镜下不能彼此区分，也不能与原发性纵膈 B 细胞淋巴瘤（上图）区分。但是用基因表达芯片（下图）方法可以将这些肿瘤分层为三个亚类，即原发性纵膈 B 细胞淋巴瘤、生发中心 B 细胞样淋巴瘤（GCB）DLBCL 和激活的 B 细胞样淋巴瘤（ABC）DLBCL。从这一表达芯片中选择了一组表达水平可以用于亚类分层的基因，并将其以点状沿垂直轴排列，而将患者肿瘤（未标出）按水平轴进行点状排列。(B) Kaplan-Meier 曲线表明患者所经历的三种肿瘤亚类具有显著不同的疾病过程。(C) 图 A 所显示的基因表达分析分层后的肿瘤显示了不同的核型和生化改变。(D) PMBL 和 ABC 细胞显示了高水平的 NF-κB 组成性表达，这一事实表明它们可能对 NF-κB、IκB 激酶（IKK；见图 6.29）的上游激活因子的抑制导致的这一信号通路破坏尤其敏感。这一现象得到了实验研究的支持。将 IKK 的药理学抑制剂 MLX105 用于以上三类淋巴瘤亚类来源的细胞系的确显示了不同的体外效应。(A and C，from L. M. Staudt and S. Dave，Adv. Immunol. 87：163-208，2005；B，from A. Rosenwald，G. Wright，K. Leroy et al.，J. Exp. Med. 198：851-862，2003；D，from L. T. Lam，R. E. Davis，J. Pierce et al.，Clin. Cancer Res. 11：28-40，2005.)

在这三类淋巴瘤中，致活的B细胞样淋巴瘤和原发性纵膈B细胞淋巴瘤表现为组成性高水平表达NF-κB（图16.5C）。这一转录因子（6.12节）可能驱动着肿瘤的增殖同时保护其免遭凋亡的命运。因此，以NF-κB为靶点的药物，尤其是作用于其上游激活因子IKK的药物，已经被用来进行DLBCL的这两个亚类的治疗尝试。在培养增殖的这两类淋巴瘤细胞中，一旦失去了IKK的活性细胞将死亡（图16.5D）。而在第三类淋巴瘤亚型——生发中心B细胞样淋巴瘤中由于细胞的NF-κB活性不高，同样的处理并不发生细胞的改变。

在组织学较复杂的肿瘤（如包含上皮和基质细胞类型的肿瘤），由于进行基因表达分析所用的RNA是来源于多种细胞类型的混合体，对其基因表达模式的解释经常会显得非常混乱。激光显微切割捕获（LCM）技术的应用能够将贴附在显微载片上的肿瘤样品中的上皮细胞与基质细胞进行物理分离。这样就可以对两组细胞的基因表达模式进行单独的和进一步精细的分析，以使对肿瘤样品进行更准确的亚类分层。

除了这些基因表达分析，还有一种涉及蛋白质组科学的新的诊断方法。在这一方法中，患者肿瘤或血清的蛋白质表达谱提供了重要的诊断信息。无论是功能基因组学和蛋白质组学，这些分析技术的长期目标都是将每一患者的肿瘤归类于某一特定亚型的疾病，并应用已经证明对这一肿瘤亚型有效的药物治疗方法进行治疗，而不是按其他亚类进行治疗。虽然它们表面上看起来相似，但同一治疗方法可能并没有效果。量体裁衣地选择药物治疗方法能在一个精确选择的患者人群中产生很高的药物反应率。

16.2 成功的抗癌治疗药物能诱发肿瘤细胞的多种反应

原则上，几种不同的生物治疗策略可能被证明能同样有效地清除肿瘤或控制肿瘤的生长。这些策略中最多的是通过凋亡诱导肿瘤细胞死亡。实际上，几乎所有现存的非手术方法都是通过这样或那样的途径激活肿瘤细胞的凋亡来清除它们。然而，另外的一种治疗策略是诱导肿瘤细胞分化。我们这里将首先简要地讨论这一策略。

如第8章所述，恶性表型的获得通常伴随着细胞的分化缺陷和有丝分裂后期事件的缺陷。我们也应该记住，随着肿瘤细胞恶性程度的增加，它们也通常丢失了越来越多的细胞分化标志分子。

这些行为为我们提示了一种有吸引力的肿瘤治疗策略：使肿瘤细胞进行分化并进入有丝分裂后期。虽然我们已经知道了许多细胞周期和分化程度调控之间的联系（见8.11节），但这些信息中的大部分仍然没有被转化成有效的治疗方法。到目前为止，一个突出的例外就是一种对急性早幼粒细胞白血病（APL）的治疗方法。在这一治疗过程中，经全反式维甲酸（all-trans-retinoic acid，ATRA；图16.6A）的治疗，未分化的白血病母细胞能被诱导分化成嗜中性粒细胞。用ATRA和化疗药物联合经常可以达到完全缓解，5年生存率达到75%～85%。这已经是完全治愈的迹象。

在APL进展的初始阶段中，特定造血细胞的正常分化程序被一个叫作PML-RAR的融合蛋白阻断。这一融合蛋白是由于15、17号染色体易位而产生的，它可见于几乎所有的APL患者的白细胞中。这一融合蛋白由未知功能的PML（早幼粒细胞白血病）蛋白融合于维甲酸受体蛋白（RAR）而形成的。正常情况下后者通过结合维甲酸配体

能够诱导全身多种细胞类型中调控细胞分化基因的表达。

实际上，PML-RAR 蛋白阻断前幼粒白血病细胞分化的精确机制尚不清楚。一个比较大的可能性是白血病细胞中发现的 PML-RAR 干扰了正常维甲酸受体（RAR）在骨髓细胞中的分化诱导功能。它会导致这些细胞处于干细胞样状态并大量累积。尽管配体激活的 RAR 可能诱导与造血前体细胞分化相关的特定基因的表达，但 PML-RAR 融合蛋白可能作为 RAR 的抑制因子，或至少是拮抗因子而发挥作用。反式维甲酸治疗产生的治疗效应大部分来源于它诱导泛素化和蛋白酶体介导的 PML-RAR 融合蛋白的降解作用，从而解除了对细胞分化的阻断作用。

一个类似的机制将维生素 A 与上述全反式维甲酸联系了起来，这可能解释了 13-顺式维甲酸（13-*cis*-retinoic acid，13cRA，图 16.6B）成功治疗疾病的原因。13-顺式维甲酸可逆转口腔或喉部的癌前病变，进而预防或推迟它们发展为头颈部肿瘤。有意思的是，RARβ 表达缺失在这些癌前病变以及其他许多种人类癌症中很常见，看起来它使这些病变细胞逃避了分化程序和有丝分裂后状态。应用反义转基因技术降低小鼠 RARβ 受体表达，18 个月后肺部形成了大量癌肿。这进一步支持逃避维甲酸诱导的分化过程是癌症发生的重要机制这样一种观点。

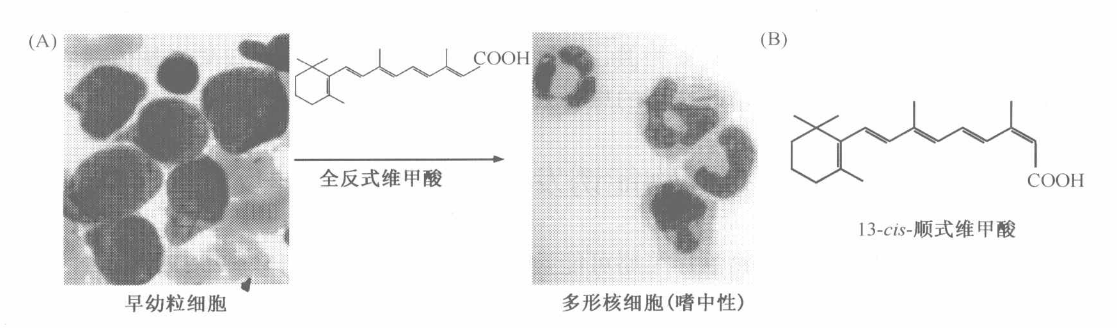


图 16.6 被诱导分化的急性早幼粒白血病细胞 （A）在急性早幼粒细胞白血病（APL）循环中存在大量胞浆中含有颗粒的早幼粒细胞（左）。而经全反式维甲酸（ATRA）治疗后，不成熟早幼粒细胞消失了，代之以分化成熟的粒细胞，尤其是多形有核中性粒细胞（PMN）（右）；（B）13-顺式维甲酸用于头颈癌症癌前病变的治疗并使其消退。（A，courtesy of P. P. Pandolfi.）

除了这两个典型的例子，分化诱导策略在治疗肿瘤模型的过程中取得的成功是较有限的。因此，许多正在探索中的肿瘤治疗方法把目光指向激活肿瘤细胞内的促凋亡信号。乍一看起来，激活肿瘤细胞内凋亡反应的尝试可能是一种无益的徒劳，因为我们已经知道肿瘤细胞通过无数的途径使细胞脱离凋亡途径（9.15 节）。但是凋亡环路的复杂性和丰余性表明即使在最恶性的肿瘤中也几乎不可避免地保留着未受干扰的凋亡环路的重要成分。正是这些仍在执行正常功能的成分可以作为激活细胞凋亡的靶点，直接或间接地将肿瘤细胞从患者体内清除。我们正在逐渐了解预测肿瘤对特定凋亡诱导治疗反应性的方法（见补充材料 48 ◎）。

许多正在研发中的新治疗策略都是通过剥夺细胞内存留的抗凋亡信号来杀死肿瘤细胞的。我们在第 9 章已经提到，肿瘤细胞通常依赖高活性的生长因子信号来产生细胞内抗凋亡信号（如 Akt/PKB），通过它们可以抑制细胞内促凋亡通路的作用。干扰肿瘤细

胞中调控 Akt/PKB 活性的上游信号级联反应中的某一个步骤可能是一种较有效的肿瘤治疗手段。

肿瘤细胞一旦脱离正常细胞周期应有的关键检验点调控就变得容易受到损伤。另一类治疗策略正是利用了这一特点。正常情况下细胞内受到损伤的基因组 DNA 或染色体被修复以前，细胞从 G_2 期进入 M 期的进程将被阻断。但在一些肿瘤细胞中缺少这一机制。结果是化疗药物或放射治疗损伤肿瘤细胞基因组时，正常细胞会发生细胞周期阻滞，修复了损伤的 DNA 后才能进入 M 期，而肿瘤细胞会忽略这些损伤并顺利地进入有丝分裂过程。但 DNA 受损后进入 M 期的肿瘤细胞可能会遇到“有丝分裂灾难”。当这些细胞试图分离它们受损伤的染色体时，细胞的持续生存能力受到了威胁（图 16.7）。这一类损伤具有突出的作用，它能够成功激活细胞内残留的凋亡反应。实际上，许多传统应用的肿瘤治疗药物被怀疑是利用了检验点调控缺陷这一特性来发挥杀死肿瘤细胞效应的，但目前也缺少支持这一观点的确凿证据。我们随后的讨论中将主要集中于靶向肿瘤细胞内关键蛋白分子的药物，而不是集中于靶向肿瘤细胞基因组的药物。

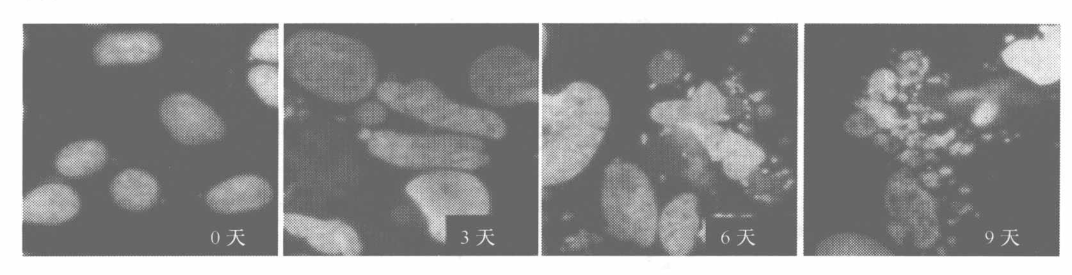


图 16.7 化学治疗与有丝分裂灾难 许多化疗药物可以损伤肿瘤细胞的染色体。由于肿瘤细胞缺少 G_2/M 期检验点调控，它们可以不经修复损伤的 DNA 而直接进入有丝分裂。这就会使它们进入“有丝分裂灾难”，从而产生非整倍体、多倍体、形成微核，并最终导致细胞死亡。从图中可以看到广泛应用的化疗药物阿霉素（doxorubicin）在低剂量（50ng/ml）下对人肝癌细胞 Huh-7 的影响。经过 9 天的培养，细胞核变大或变小，并形成最终的只含少量染色体的微核。这些改变将通过凋亡导致细胞死亡。（From Y. W Eom, M. A. Kim, S. S. Park et al., Oncogene 24: 4765-4777, 2005.）

16.3 从生物功能的角度来考虑，肿瘤细胞内的缺陷蛋白只有一部分具有作为药物开发靶点的前景

研究者们的兴趣在于发展新的、高度特异性的抗肿瘤药物，使其能够专门治疗某一类型的肿瘤。但同时他们也面对着这样的一个现实：一般小分子质量有机化合物的药物通常通过抑制生物化学功能来发挥作用，而不是提高这些功能。这一事实极大地缩小了抗肿瘤药物开发的可选择性。

正如我们在第 7 章所述，肿瘤抑制基因的蛋白产物（也就是所谓的守门员）的缺失对于肿瘤的发生发挥着作用。因此，通过发展低分子质量化合物来代替或补偿这些缺失的功能看起来还是比较遥远，而且这种状况可能还要持续很久。这里仅举出取得成功的

有限的几个例子。例如，某些化合物能够将突变的p53蛋白从功能缺陷的立体化学构象转变成野生型的构象，从而恢复其功能。

我们所讨论的这种情况同样可以拓展到维持细胞基因组稳定的其他蛋白——caretaker（第12章）。它们的功能在肿瘤细胞内经常是缺失的，但并不能被甚至是最复杂的药物分子所恢复。即使能够被修复，它们的实用性也是很有限的。毕竟，如果肿瘤的进展是由缺陷的DNA修复所驱动并已经导致了突变等位基因积累，那么恢复缺失的修复功能对许多已经积累在肿瘤细胞基因组中的基因突变来说已经毫无作用了。

在这一思路里，除了gatekeeper和caretaker以外，正常细胞内过度激活的促进生长或生存的蛋白——癌蛋白，就成了抗肿瘤治疗中最有吸引力的靶点了。这些蛋白分子原则上能被药物分子抑制，导致它们的活性下降，如果幸运的话会导致肿瘤生长过程的阻断。实际上，由于癌蛋白中的大部分也是信号转导过程中重要的阳性效应分子，被激活的癌蛋白下游的信号转导蛋白分子也是有吸引力的治疗靶点（见图16.8）。

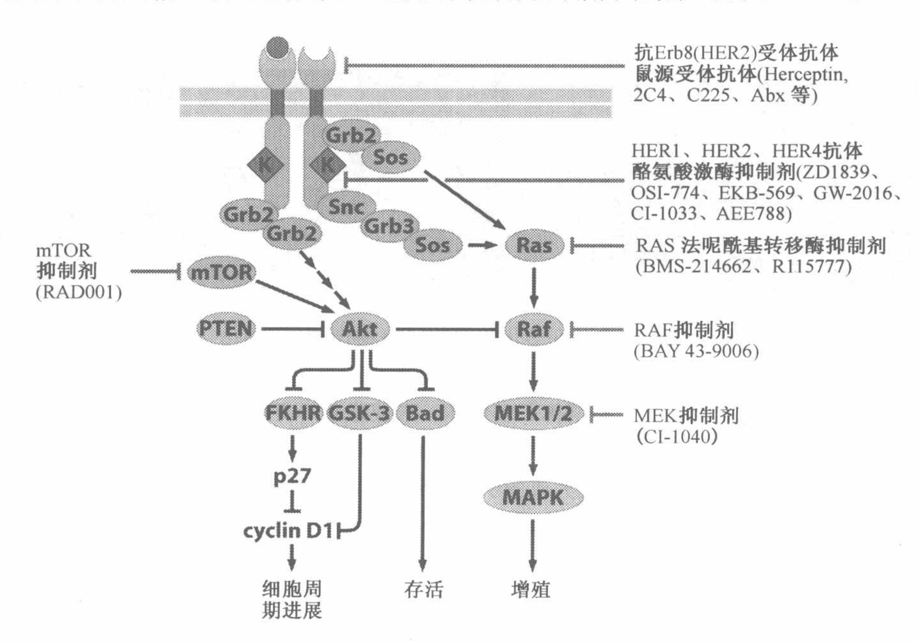


图16.8　通过靶向下游信号转导分子抑制肿瘤生长　如图所示，EGF（HER1）和HER2/Neu等受体触发的信号转导可被多条途径所抑制。Herceptin等单克隆抗体可靶向受体的外部功能区。这些受体的酪氨酸激酶信号触发区可被许多低分子质量化合物所结合。另外，已经开发了一些靶向下游信号转导通路蛋白分子的药物。这些药物能抑制Ras（通过抑制其翻译后成熟过程中的farnesylation）、Raf和MEK（通过抑制它们的丝/苏氨酸激酶催化功能）、mTOR（通过抑制mTOR与相关蛋白之间功能性信号复合体的形成）等。

如果只从遗传的角度考虑的话会进一步缩小抗肿瘤药物开发中有前景的分子靶点的可选范围。在前面，我们已经知道肿瘤进展过程中细胞群体会连续获得遗传和生物化学方面的改变，并最终导致这些细胞发展成肿瘤样的生长状态（第11章）。这一事实为我们提出了一个具有挑战性的问题：这些改变负责肿瘤发生这一多步骤过程的早期事件，

那么它们在后来肿瘤充分获得恶性表型的过程中还发挥着重要的作用吗？例如，如果肿瘤发生的起始阶段有 *ras* 癌基因形成，那么它在随后高度恶性进展的子代细胞中还会继续获得该基因的持续作用吗？或者说随后肿瘤进展过程中是否发生了一些改变，使 Ras 癌蛋白的持续作用不再必要？

以胰腺癌为例，在绝大部分这种肿瘤中（90%）存在 K-*ras* 癌基因。由于突变 K-*ras* 基因通常发现于胰腺上皮内瘤样病变（PanIN；图 16.9）和癌周的良性边缘内，因此认为这一癌基因的获得发生在肿瘤进展的相对早期阶段。一些随后获得的改变，如 *Smad4/DPC4* 和 $p16^{INK4A}$ 基因使得 K-Ras4B 癌蛋白过多表达，使得封闭 K-*ras* 通路的药物将对这一类肿瘤无效。

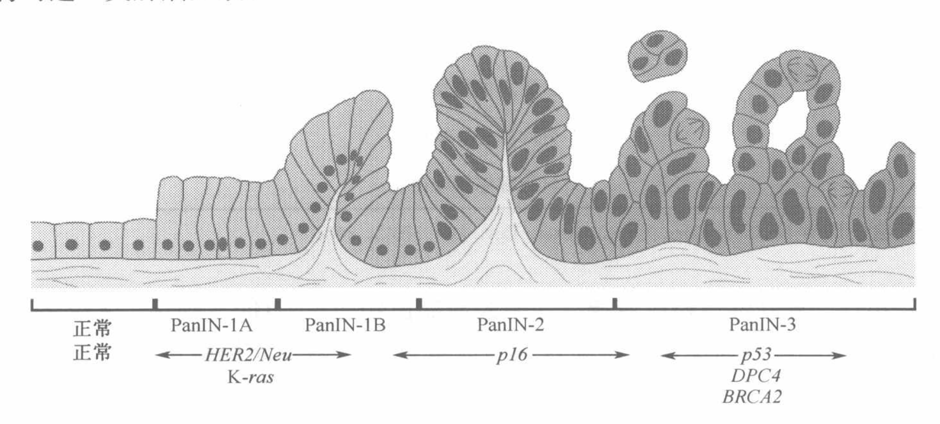


图 16.9 胰腺癌的进展 确定治疗干预靶点的一个关键问题在于肿瘤的多阶段进程早期发生的遗传改变和突变蛋白在随后的肿瘤充分进展的过程中是否还是必要的。例如，胰腺上皮内瘤样变（PanIN）的一系列组织学形态被认为是向早期胰腺肿瘤进展的不连续进程。在 PanIN-1A 阶段中，K-*ras* 癌基因大部分处于突变的活性状态。这就提出了这样一个问题：是否在后来的侵袭性和转移性的晚期胰腺癌（未展示）中仍持续发挥作用。（From R. E. Wilentz，C. A. lacobuzio-Donahue，P. Argani et al.，Cancer Res. 60：2002-2006，2000.）

在这里，我们通过肿瘤进展的小鼠模型获得了一些启示（表 16.1）。在这些转基因鼠中能够通过实验手段在肿瘤最终发生后的几个星期内关闭负责启动肿瘤进展的癌基因。这些实验表明，H-*ras* 癌基因能产生黑色素瘤，K-*ras* 能诱导肺腺癌，*bcr-abl* 癌基因能诱发白血病，而 *myc* 癌基因能够产生胰岛细胞癌和白血病以及淋巴瘤。在这些例子中，当癌基因的表达被关闭后肿瘤发生了消退，因此我们认为这些肿瘤细胞的进展是需要启动癌基因的持续存在的。某些人类肿瘤细胞的生物行为也表明了启动肿瘤发生的遗传元件是持续发挥作用的（信息栏 16.1）。

表 16.1 关闭有肿瘤发生倾向小鼠中启动肿瘤发生的癌基因的表达的影响

转基因的癌基因	肿瘤的反应
关闭转基因后降解过程	
H-*ras*	黑色素瘤萎缩
K-*ras*	肺腺癌消退

续表

转基因的癌基因	肿瘤的反应
关闭转基因后降解过程	
bcr-abl	B细胞白血病消退
myc	T细胞淋巴瘤，急性粒细胞白血病消退
fgf-7	肺上皮异常增生消退
SV40 LARGE *T*	如果转基因表达小于4个月唾液腺异常增生消退
关闭转基因后肿瘤持续存在或复发	
SV40 LARGE *T*	如果转基因表达大于4个月唾液腺异常增生复发
neu	乳腺腺癌复发
myc	乳腺腺癌持续存在
wnt	乳腺腺癌持续存在

部分改编自 D. W Felsher，Curr. Opin. Genet. Dev. 14：37-42，2004.

信息栏 16.1　启动性遗传改变持续作用的最突出例子——HeLa 细胞，人宫颈癌细胞系 HeLa 的生物学行为提供了启动性遗传改变持续作用的最极端例子　这一细胞系是1951年从一高度恶性的宫颈癌分离出来的（补充材料25◎）。与大部分（>99.7%）宫颈癌类似，这一肿瘤的启动可以归因为人乳头瘤病毒（HPV）感染（在HeLa细胞为HPV18型及它的两个癌蛋白E6和E7）。在随后的半个世纪里，HeLa细胞经历了几千代的细胞生长-分裂的周期循环，也通过遗传手段关闭了HPV18癌蛋白在细胞内的表达。E7表达的关闭导致pRb蛋白功能和细胞衰老的重新激活，而E6表达的关闭导致这些细胞中p53蛋白表达及衰老或凋亡过程的恢复。因此，在HeLa细胞这一例子中，启动性的遗传改变（HPV基因组的获得）对维持随后癌细胞的生存力和几千代的增殖来说是一种持续性的关键因素。

然而，对另一携带 *myc* 癌基因的鼠系所进行的实验则产生了同样令人注目却截然不同的结果：关闭 *myc* 癌基因表达最初能导致转基因诱导淋巴瘤的消退，但20%的小鼠出现了肿瘤复发；复发的肿瘤细胞不仅显示了初次形成的肿瘤的特征，还无一例外地显示了附加的核型改变。这表明除了诱发初始的淋巴瘤形成，*myc* 转基因还能促进遗传改变的发生，这使得肿瘤细胞在后来的进展中不再需要 *myc* 本身的持续作用。诸如此类的实验使抗肿瘤药物灭活特定的肿瘤启动癌基因的治疗更为复杂，因为一旦肿瘤发生，几年后这些蛋白可能在维持细胞的生命和生长方面已经不再发挥重要的作用了。

16.4　蛋白分子的生物化学特征也决定了它们是否具有作为治疗靶点的前景

已经被选择作为药物干预靶点的蛋白分子的生物化学方面的微妙特征使发展新的抗

肿瘤药物的尝试变得更为复杂。这些药物几乎全部是小分子质量有机化合物，因为：①总的来说，这些小分子化合物比高分子质量化合物要容易合成得多；②小分子更容易穿透肿瘤间隙，从而对所有的肿瘤细胞发挥治疗效应。

从靶分子的角度来说，它们的结构上必须具有能与小分子药物强烈并特异作用的结构域。致力于将药物释放入肿瘤细胞来攻击特异靶点的药物化学家们将这些潜在分子靶点（如癌蛋白）分成两个主要类别——可作为药物靶点的和不可作为药物靶点的。可作为药物靶点是指靶分子具有容易被小分子质量化合物攻击和抑制的结构。除了这些和其他一些限制条件，靶分子总是各种各样的蛋白质。

如果一个蛋白具有可确定的酶功能和已经明确的用来执行功能的催化结构，那么就认为它是可作为药物靶点的。这些催化结构令药物研发者们非常感兴趣，因为它们代表着可以高度特异地结合有机小分子的相对小的间隙。这些小间隙为小分子质量化合物与多个氨基酸残基之间围绕腔隙壁形成非共价键提供了可能（图 16.10）。这些彼此非依赖性的接触使药物分子能够高特异性与高亲和力地结合于靶蛋白。同样重要的是，由于药物分子占据了蛋白分子的重要功能区，它们的结合很可能会干扰蛋白质功能。

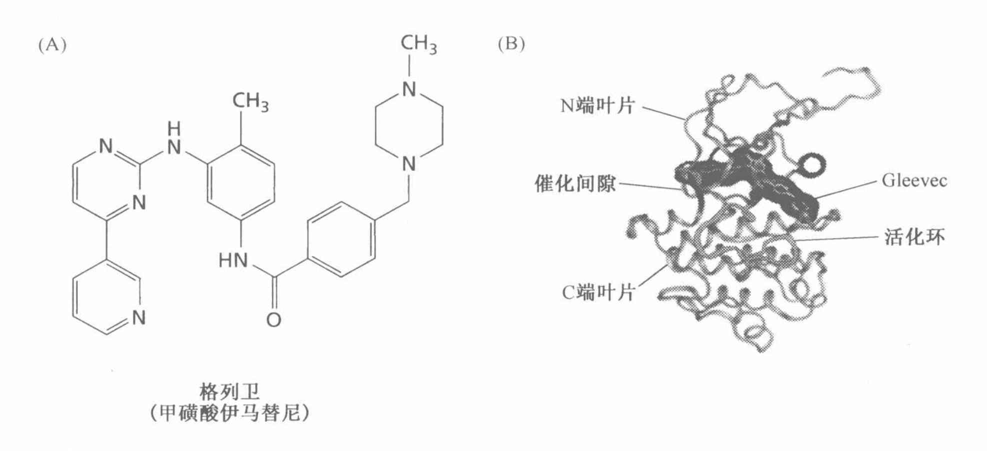


图 16.10 药物与其靶点的复杂接触 （A）格列卫（Gleevec）的化学结构。格列卫是通过优化前体化合物（去掉前体化合物中的一些侧链并加入一侧链）的结构而获得，用来抑制急性髓性白血病（CML）中激活的 Bcr-Abl 融合蛋白的酪氨酸激酶活性。（B）Abl 激酶的催化间隙位于 N 端叶状结构与 C 端叶状结构之间，如图绿色条带结构所示。格列卫分子的空间-填充模型（范德华力）用深蓝色表示，正常情况下以催化间隙阻止底物进入的 Abl 活性环结构用浅蓝色表示（当激酶转变为激活构象时这一活性环的冀状结构向外伸出）。（A and B，from B. Nagar，W. G. Bornmann，P. Pellicena et al.，Cancer Res. 62：4236-4243，2002.）

缺乏这些催化间隙的蛋白分子通常认为不可作为药物靶点。例如，转录因子是一类普遍认为不可作为药物靶点的分子，就是因为它们通常缺乏催化间隙，并缺乏备受关注的药物结合的“口袋”。这些原因使诸如 Myc 和 Fos 之类的转录因子癌蛋白被归于不可作为药物靶点的分子。同时，也正是由于这些原因而使许多参与肿瘤发生的激酶成为可作为药物靶点的分子［转录因子缺少药物开发价值的一个例外是核激素受体，如雌激素

受体和孕酮受体。由于它们具有激素结合结构域，总体上说这些受体蛋白对假配体的干扰是很敏感的，如他莫昔芬（tamoxifen）结合并拮抗雌激素受体的功能]。药物化学家们认为平均有 1/5 的细胞蛋白可作为药物靶点。

具有可识别的催化功能和明显的药物开发价值本身便意味着已经鉴定了它的作用靶点。拿 Ras 癌蛋白的例子来讲，它已经被清楚地证明具有催化活性——GTP 酶活性。正如 5.9 节所述的那样，由于 Ras GTP 酶发挥 Ras 信号通路的负调控作用，在表达 Ras 的细胞中这一酶活性从没有成为药物开发的靶点。它对 Ras 信号的抑制作用首先将会放大已经存在的由于氨基酸置换产生的突变 Ras 蛋白的灾难效应。一些酪氨酸磷酸酶也会出现上述情况，它的本来作用是逆转具有促细胞生长作用的酪氨酸激酶的活性。正是考虑到直接攻击 Ras 蛋白的困难性，一些研究策略将研究焦点转向修饰 Ras 蛋白从而使其成为发挥功能的酶类（补充材料 49 ◎）。

从分子间隙为药物开发提供了潜在靶点这一观点出发，许多类型的蛋白-蛋白相互作用也代表着一类可作为药物开发的靶点。毕竟，位于物理空间上互相接近的蛋白之间的狭窄空间产生了一个高度特异的药物结合袋。因此，这一间隙中插入药物分子会使蛋白-蛋白相互作用变得不稳定，甚至阻断这种作用。这一抑制作用显而易见的候选分子是一些类型的 cyclin-Cdk 配对分子，它们的作用驱动着所有癌细胞的增殖（第 8 章）。

不幸的是，许多通过定制的药物分子阻止这些蛋白-蛋白相互作用的尝试并没有获得成功。从众多的失败中总结到了以下几点：两个蛋白分子的相互作用涉及结合面的多个结合的位点。这些接触位点的延伸超过了分子结构域。这些结构域极大地超过了药物分子的空间结构（如$<10^3$）。因此，只有一小部分位于两个相关蛋白之间的接触位点能够被这类药物阻断，大部分的相互作用基本上未受到干扰。

这是一个已经被广泛认可的观点。但 2003 年公布了一项例外情况。一个小分子质量化合物抑制了 Mdm2-p53 复合体的形成（图 16.11A）。这一进展意味着从道理上说多种类型人类肿瘤中，由 $p14^{ARF}$表达缺失或 Mdm2 过表达而导致的 p53 缺失是可以通过药物处理而恢复的。

在几个月之内，报道了更多的这一规则的例外情况。从绿茶与红茶中分离到的天然化合物能够在较低浓度下阻断抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 $Bcl\text{-}X_L$对促凋亡蛋白 BH3 的结合和中和作用（图 16.11B）。另一个通过高能量筛选得到的化合物 ICG-001 能够抑制 β-catenin与 CBP（cAMP 反应元件结合蛋白）的相互作用。CBP 是一广泛作用的转录共激活因子，与 β-catenin 共同作用诱导一些关键基因的表达，包括 survivin（见表 9.5 和 9.13 节）和 cyclin D1 等。其中 survivin 是一个重要的抗凋亡 IAP 蛋白（图 16.11C）。一年以后，另一个抗凋亡蛋白的抑制物被报道，它能够抑制 Bcl-2、$Bcl\text{-}X_L$ 和 Bcl-2 蛋白的作用。这一化合物也是合成的有机化合物（图 16.11D），在接近 1nmol/L 的浓度下即能与抗凋亡蛋白发生亲和作用。这一浓度比茶提取化合物的亲和力高两个数量级。

具有 β-catenin 抑制作用的物质具有应用于治疗结肠癌的前景。正如前面已经叙述过的那样，β-catenin 的异常聚积几乎在所有的这些肿瘤的发生过程中发挥着关键的作

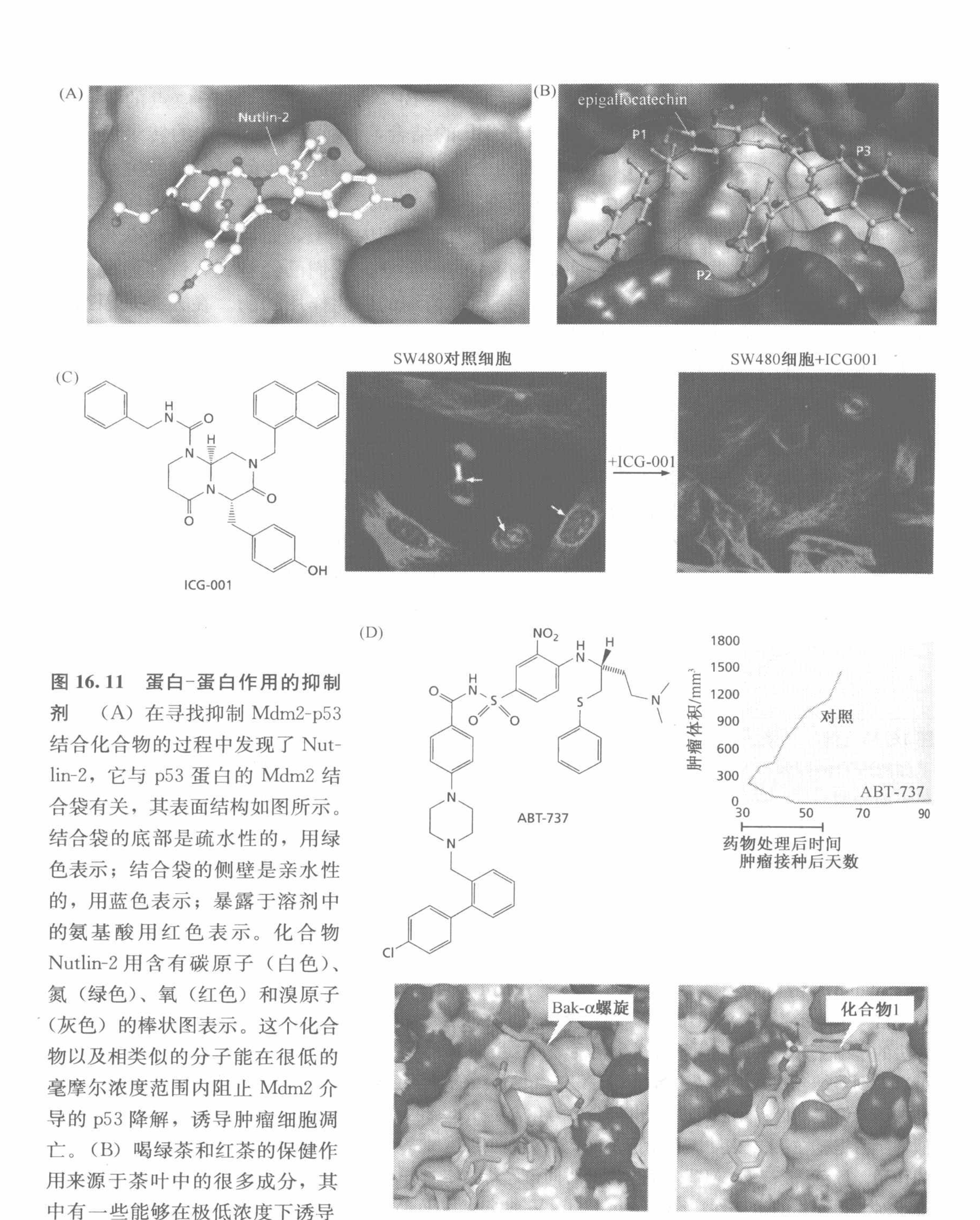


图 16.11　蛋白-蛋白作用的抑制剂　(A) 在寻找抑制 Mdm2-p53 结合化合物的过程中发现了 Nutlin-2，它与 p53 蛋白的 Mdm2 结合袋有关，其表面结构如图所示。结合袋的底部是疏水性的，用绿色表示；结合袋的侧壁是亲水性的，用蓝色表示；暴露于溶剂中的氨基酸用红色表示。化合物 Nutlin-2 用含有碳原子（白色）、氮（绿色）、氧（红色）和溴原子（灰色）的棒状图表示。这个化合物以及相类似的分子能在很低的毫摩尔浓度范围内阻止 Mdm2 介导的 p53 降解，诱导肿瘤细胞凋亡。(B) 喝绿茶和红茶的保健作用来源于茶叶中的很多成分，其中有一些能够在极低浓度下诱导肿瘤细胞凋亡。从绿茶中提取的 epigallocatechin gallate（EGCG；见棒状图）与重要的抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 结合，抑制常数为 490nmol/L；与 Bcl-2 结合后的抑制常数为 335nmol/L（这些常数的数值反映了这些蛋白的活性被抑制 50%时的药物浓度；nmol 以下范围的值意味着很高的效能）。

用，导致这个蛋白与核内转录因子 Tcf/Lef 的共同作用和一系列靶基因的过度表达，如 cyclin D1 和 Myc（7.11 节）。一旦 β-catenin-Tcf/Lef 复合体在核内基因启动子区形成以后，它将招募其他一些蛋白，如转录共激活因子 CBP，后者协助启动子位点的染色质重塑。药物 ICG-001 抑制 β-catenin-Tcf 与 CBP 的结合，从而失去复合体的转录诱导活性。从更广泛的意义上来讲，以上列出的四个成功的例子会进一步鼓舞其他研究者们致力于寻找关键蛋白质-蛋白质相互作用的药理学抑制物的尝试。

激酶是一种可作为药物靶点的、很有吸引力的细胞内分子，而且我们已经获得了许多成功的经验，但这些激酶只属于细胞内很小的一部分。我们已经看到，许多激酶发挥癌蛋白的功能，它们驱动着肿瘤的增殖，是具有精细的催化作用的酶。在人类基因组中至少已经发现了 518 种编码不同激酶的基因，其中有 90 种编码酪氨酸激酶，它们是许多人类肿瘤中的主要作用分子。

对于许多肿瘤研究者来说，这些肿瘤内的潜在药物靶点的复杂性既是一种财富，也是一种困窘。但对于药物化学家来说，这样的数量简直是一种恶梦。因为几乎所有的蛋白激酶之间都有进化上的相关性（图 16.12），而且它们的催化间隙在结构上都是相似的。这种相似性在亲缘性更高的酪氨酸激酶之间简直是令人惊奇的（图 16.13），而酪氨酸激酶参与了肿瘤的发生。如何才能开发既能干扰肿瘤相关激酶的功能，又能保留细胞正常生存所需要的激酶不受影响的药物呢？以下介绍的推理性药物设计和高通量筛选（HTS）法将尝试解决这些问题。

图 16.11（续） 将核磁共振（NMR）结合分析、荧光极性分析和计算机对接分析技术相结合，得到了如图所示的图像，显示了 EGCG 泊于 Bcl-X_L（用黄色与绿色表示）的三个相邻疏水袋中。其分子表面如图所示，标记为 P1、P2、P3。这些疏水袋组成了一个 Bcl-X_L 的疏水结构域。Bcl-X_L 在许多肿瘤中有高表达，能与 BH3 仅有蛋白这类促凋亡分子的结合并消除其促凋亡作用（见图 9.25 和图 9.27）。(C) 小分子化合物 ICG-001（左）抑制复合体β-catenin-Tcf/Lef 与转录共刺激因子 CBP 的相互作用。转录因子复合体诱导凋亡抑制因子（ inhibitor of apoptosis，IAP；见 9.13 节）surviving 编码基因的表达。图中可见，survivin 的表达（右侧两个图区中的绿色与黄色免疫荧光）在人结肠癌细胞 SW480 中的表达是正常的，而在 ICG-001 存在的情况下，survivin 的表达明显降低。两图中的微管蛋白（tubulin，用红色表示）用于复染。本实验中使用浓度下的 ICG-001 使 survivin 启动子的活性降低了 6 倍（未显示）。(D) ABT-737（第一图区）是在联合应用核磁共振扫描、并行合成法及结构设计方法的基础上开发的。它用于可视化观察促凋亡蛋白 Bak 与候选药物分子（化合物 1）的作用结构。可以看到，结合并抑制抗凋亡蛋白 Bcl-X_L（红色、白色与蓝色表面）的促凋亡蛋白 Bak 的螺旋区（绿色螺旋，第三图区；见图 9.25）也被命名为化合物 1（绿色棒状图，第四图区）的 ABT-737 化学类似物所占据。在第二图区中显示了 ABT-737 对人小细胞肺癌（small cell lung cancer，SCLC）移植瘤的作用。黑色线条表示 ABT-737 作用的时间窗。药物本身并未表现出促凋亡作用，但它能增加肿瘤细胞对其他药物的敏感性。(A，from L. T. Vassilev，B. T. Vu，B. Graves et al.，Science 303：844-848，2004；B，from M. Leone，D. Zhai，S. Sareth et al.，Cancer Res. 63：8118-8121，2003；C，left，from K. H. Emami，C. Nguyen，H. Ma et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101：12682-12687，2004；C，right，from H. Ma，C. Nguyen，K. S. Lee and M. Kahn，Oncogene 24：3619-3631，2005；D，from T. Oltersdorf，S. W. Elmore，A. R. Shoemaker et al.，Nature 435：677-681，2005.)

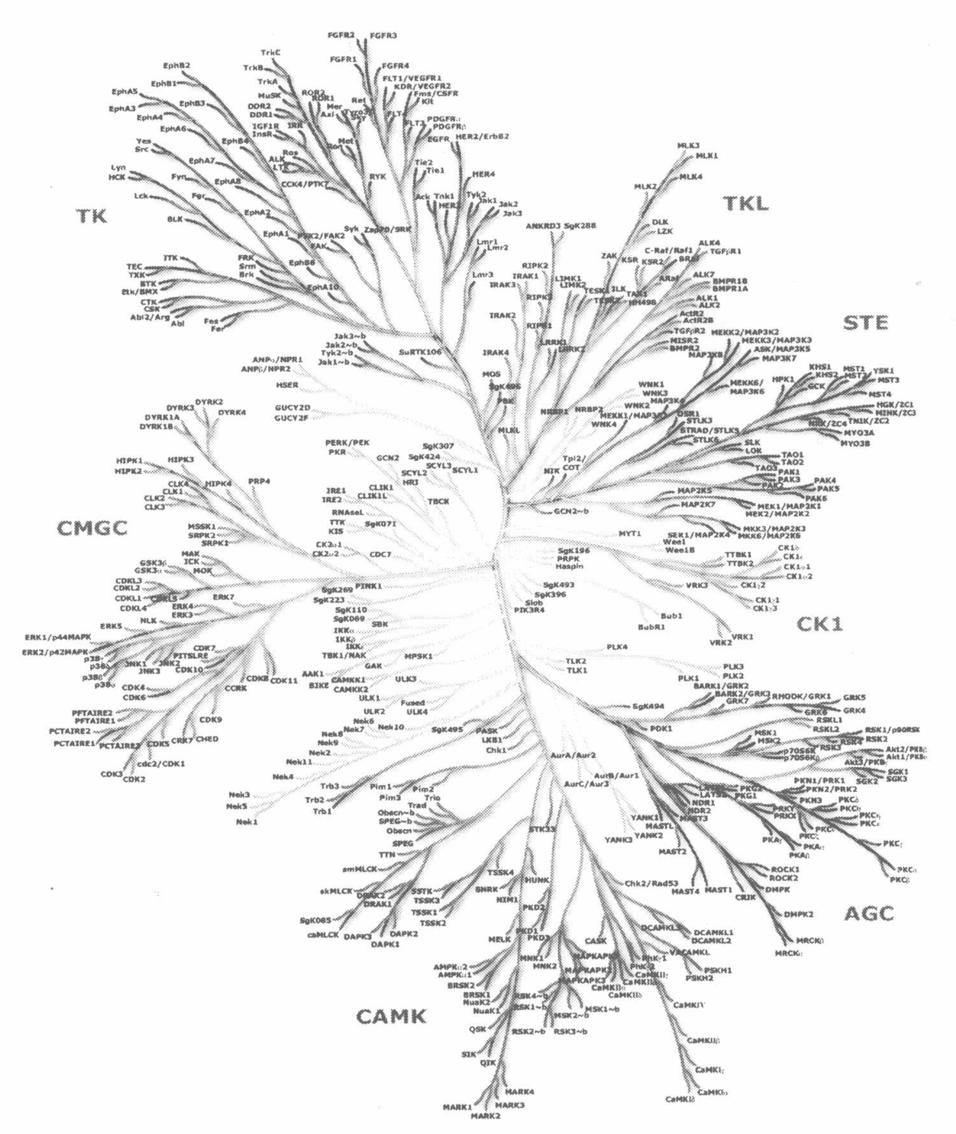


图 16.12　人类激酶组　如图所示，包括丝/苏氨酸和酪氨酸激酶在内的大部分哺乳细胞蛋白激酶具有结构上的明显相似性，表明它们来源于真核生命呈树形进化形成前就已经存在的同一个原始蛋白激酶。在很久以前丝/苏氨酸和酪氨酸激酶就已经互相交叉进化，并在过去的大约 10^9 年间进一步分化。

人类基因组序列中总共发现了 518 个编码不同蛋白激酶的基因。它们作为一个整体被称为“人类激酶组”。在这些激酶中，有 90 种激酶催化酪氨酸残基的磷酸化，而其余的激酶催化底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。所有的酪氨酸激酶（TK）和 318 种丝/苏氨酸激酶均显示出明显的结构上的相关性。如果将它们排列在进化树上，可以描绘出它们是如何通过彼此间重复基因复制进化出这种多样性的［一小部分“非典型”蛋白激酶代表了独立的进化过程（未显示）］。位于进化树上的激酶具有相同的起源，表明这些酶中有很多是在结构上彼此相似的。这就使开发只选择性干扰这一激酶大家族中一小部分成员的药物更为复杂。

TK（左上）代表着较近的进化关系，因为它们在原核细胞中缺乏却存在于目前已经测序的很少数单细胞真核原虫的基因组中（如 3 个）。激酶的巨大多样性和专门化对于解剖上十分复杂的多细胞生物的进化来说是非常重要的。位于进化树上的其他激酶家族为 TKL-酪氨酸激酶样，STE-酵母不育激酶 7、11、20 同源蛋白，CK1-酪蛋白激酶 1，AGC-蛋白激酶 A、G、C 家族成员，CAMK-钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶和 CMGC，包括 CDK、MAPK、GSK-3、CLK 家族。(Courtesy of Cell Signaling Technology，Inc.)

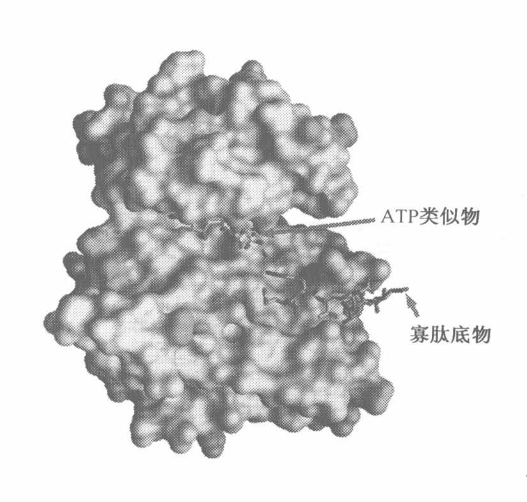


图 16.13　激酶的相似结构　表面结构图说明了相关激酶之间结构相似性的一个极端例子。该图对胰岛素受体（IR）与胰岛素样生长因子受体（IGF-1R）的酪氨酸激酶结构域的催化间隙与邻近的氨基酸残基进行了比较。相同的氨基酸残基用灰色表示，不同的氨基酸残基用绿色表示。该图表示出这两个TK结构域有多么的相似，这也解释了为什么很难找到只抑制一种酪氨酸激酶受体而不影响其他酪氨酸激酶受体的抑制物。联结激酶两叶的肽段中的一个苏氨酸用黄色标出，同时还标出了表示ATP类似物和寡肽底物的棒状图（橘黄、蓝、红、黄色表示）。几乎所有的TK拮抗药物都结合于它们所抑制的激酶的ATP结合位点。（From S. Favelyukis, J. H. Till, S. R. Hubbard and W. T. Miller, Nat. Struct. Biol. 8：1058-1063，2001.）

16.5　药物化学家能设计和开发一系列潜在药物分子的生物化学特性

"推理性药物设计"的概念包括了以下观点：①设计的药物应该能够靶向于细胞内已知功能失调并促成疾病状态的特异蛋白分子；②这些作为治疗干预有吸引力的靶点的候选蛋白要经预测分析具有可作为药物开发的特点；③这些靶蛋白的细微分子结构要为拟开发药物的化学结构设计提供信息。更详细地说就是合成的化学分子必须能够在微细的三维结构上与大蛋白分子的特殊袋或位点以"钥匙与锁"的方式紧密结合，攻击或灭活靶蛋白（见图16.14）。

原则上说，一个熟练的有机化学家能够根据对靶蛋白的潜在药物结合腔详细结构的了解来设计合成药物分子，该分子能够通过共价键与靶蛋白活性袋表面氨基酸结合，并很好地吻合于腔隙中。但是，这一设计新药物结构的纯理论方法还没有产生实践中可用的药物产品。因此，当前的药物发现还更多地依赖于通过经验性的方法发现有用的分子结构（补充材料50◎）。

补充材料50◎的说明中并没有叙述开发抗癌药物相关的生物化学与生物学方面的问题。这里面临的主要挑战是通过临床前的细胞与动物实验研究来预测药物的临床（即患者）反应。例如，假设我们通过高通量筛选技术得到了一个能在10～100mmol/L浓度（即靶蛋白的活性被抑制50%所需要的浓度范围）范围抑制活细胞内靶蛋白活性的药物分子。这一特定药物的进一步开发是不现实的，原因是在患者体内达到治疗效应时所需药物的用量太大了。这一类分子的化学特性可能使其能进行衍生作用（这一化合物的修饰后衍生物的合成）以生成在纳摩尔浓度下即能发挥作用的分子。当然，这些分子也有可能根本不能产生类似的衍生物。

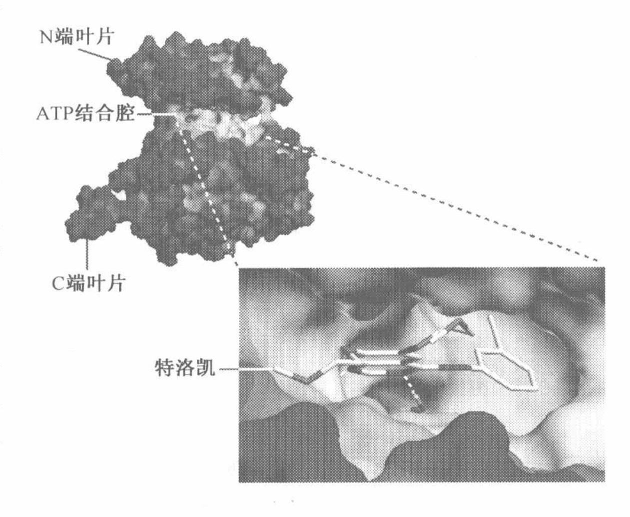


图 16.14　特洛凯（Tarceva）与 EGF 受体的激酶结构域　通过 X 射线晶体学获得的 EGF 受体酪氨酸激酶结构域催化间隙空间填充模型显示特洛凯（棒状图）完美地结合于催化间隙的 ATP 结合腔，并抑制了该受体的信号转导。药物与靶蛋白的三维结构的互补对于药物的结合来说是不够的，因为通过氢键形成产生的特异结合，药物分子与蛋白分子的药物结合袋表面的氨基酸之间必须形成以氢键（未显示）为主的特异性结合。图中也显示出了以氢键结合于特洛凯分子的一个水分子。（Courtesy of C. Sambrook-Smith and A. Castelanho, OSI Pharmaceuticals Inc.; see also J. Stamos, M. X. Sliwkowski and C. Eigenbrot, J. Biol. Chem. 277：46265-46272，2002.）

接下来进行的临床前研究包括比较药物对目标靶点和其他细胞内类似蛋白的靶外效应。这一步骤的目的是确定药物抑制靶蛋白的浓度是否比影响其他细胞内相似蛋白所需的浓度低得多（10～100 倍）（实际上，由于哺乳动物细胞内有 20 000 种甚至更多不同的蛋白结构，这一检测并不能排除研究中的药物对细胞内结构上并不相关的蛋白产生影响的可能）。

对于目前药物开发中广受关注的酪氨酸激酶抑制剂来说，虽然人们试图鉴定一个药物影响的所有的激酶，但目前也只涉及了人类细胞内已知的蛋白激酶大家族中的很小一部分。结果是研究者们可能会漏掉药物的某些靶外效应。但这一现象随着更系统性的药物筛选方法的出现逐渐改变。该方法能在大得多的激酶范围中筛选出这些抑制剂可能影响的激酶。

例如，一个生物技术公司开发了一个检测受测药物对位于激酶谱树（见图 16.12）中不同分支的 156 种不同激酶的结合亲和力的方法（图 16.15）。该方法发现我们将在后面详细讨论的两个 EGF 受体抑制剂易瑞莎（Iressa）和特洛凯（Tarceva）确实优先结合于 EGF 受体的酪氨酸激酶区。而据认为会广泛抑制所有类型蛋白激酶的十字孢碱（staurosporine）也确实显示了广谱的激酶结合能力（这个方法中检测的受测药物对于激酶的结合亲和力能够预测该药物对激酶活性的抑制能力）。

通过与这一方法类似的筛选技术发现药物的靶外效应（我们会在后面见到）能够在两方面发挥实际作用：①它可能解释了药物的毒性——在肿瘤靶点以外的组织产生非期望的副作用；②由于药物可能会抑制药物开发中并没有考虑到却在某种肿瘤中发挥活性的激酶，这种靶外效应能发现药物的新的临床应用。

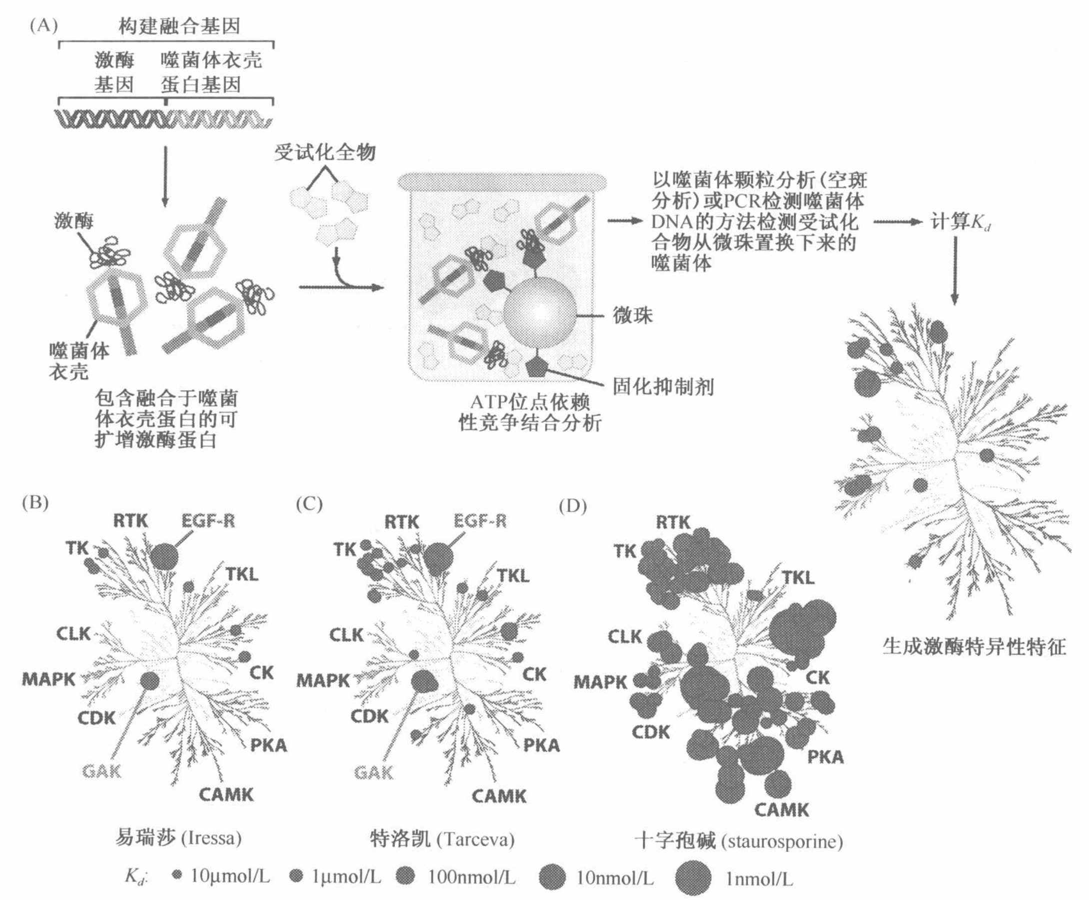


图 16.15　激酶抑制剂对诸多蛋白激酶的效应　通过检测每一抑制剂与包含 156 种不同酪氨酸或丝/苏氨酸激酶的芯片中任一激酶的结合力，我们得到了激酶对不同激酶抑制物的个体反应。这一检测方法是建立在射箭所有的激酶抑制物均结合于目标激酶的 ATP 结合位点这一事实基础上的。(A) 编码激酶结构域的 cDNA 被克隆到噬菌体载体内，使噬菌体表达含激酶结构域（紫色）的衣壳（绿色）融合蛋白，然后用一个已经能结合许多激酶 ATP 位点的 ATP 类似物固化于微珠（浅蓝）。这使噬菌体颗粒能通过衣壳上的融合蛋白结合于固化了 ATP 类似物的微珠。待测化合物（候选酪氨酸激酶抑制剂，黄色）与固化于微珠的抑制剂（红色）竞争，从而阻断噬菌体与微珠的结合。该方法正是检测了待测化合物的这种竞争能力。通过检测微珠释放的噬菌体颗粒的数目（用噬菌体噬斑分析或用噬菌体 DNA 进行聚合酶链反应）可以发现噬菌体与微珠的结合被阻断了。从置换常数（K_d，即 50%的噬菌体从微珠被置换出来时的化合物浓度）可以看出待测化合物与融合蛋白中激酶的亲和力的大小。其他图区中每一激酶均显示 K_d 小于 1μmol/L [用红色圆圈表示，其直径与结合常数 K_d 呈反比，其位置表明激酶在激酶谱树中所处的位置（见图 16.12）]。图区 (B) 和 (C) 分别显示了两个已经批准临床应用的 EGF 受体抑制剂易瑞莎和特洛凯的效应。图中显示了两者均对 EGFR 具有较强的特异性，而对其余 155 个激酶的作用较弱。但易瑞莎在 10 倍浓度情况下也能结合细胞周期素 G 相关激酶（cyclin G-asso-ciated kinase，GAK；见信息栏 5.3），而特洛凯能在较高浓度下影响 GAK，这个浓度仅稍高于抑制 EGFR 的作用浓度。(D) 与此形成对比的是，被认为对许多激酶发挥抑制作用而广泛应用于实验研究的药物十字孢碱确实能与许多激酶结合，有些结合甚至是在 nmol 以下的浓度发生的。（A，from J. D. Griffin，Nat. Biotechnol. 23：308-309，2005；B，C，and D，courtesy of P. R. Zarrinkar and D. J. Lockhart，Ambit Biosciences；see also M. A. Fabian，W. H. Biggs 3rd，D. K. Treiber et al.，Nat. Biotechnol. 23：329-336，2005.）

16.6 进行候选药物的有机体整体试验以前要在细胞模型上进行检验

一个药物显示了在溶液体系中抑制纯化的靶蛋白的能力后，通常要在培养细胞水平上进行检验。对格列卫来说，最初发现它能抑制分离的 Bcr-Abl 融合蛋白的酪氨酸激酶的活性。而已知这一融合蛋白具有驱动慢性粒细胞白血病（CML）癌细胞生长和生存的功能。已经明确了该药物对纯化的融合蛋白的作用后，药物开发者们开始进行下一步的工作，即选择体外生长和生存依赖于该融合蛋白持续作用的培养细胞系进行验证。

图 16.16 显示了一项格列卫开发后经过一段时间进行的细胞学试验的例子。这一试验中使用了鼠类的前 B 淋巴细胞系。正常情况下该细胞系需要培养基中存在白细胞介

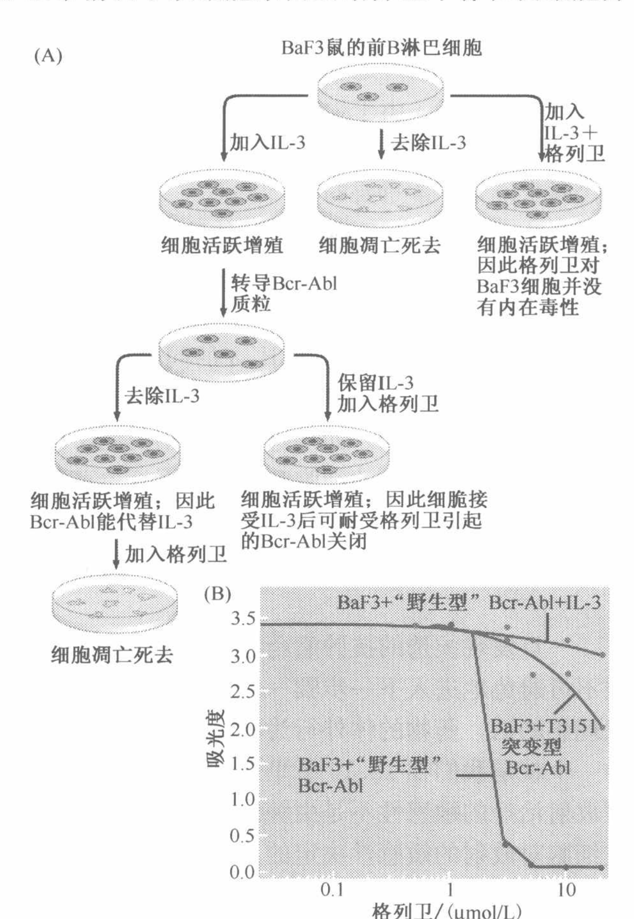


图 16.16 在培养细胞中检测格列卫的作用 (A) 正常情况下，鼠源前 B 淋巴细胞系 BaF3 需要在培养基中补充IL-3来维持细胞的生存和增殖（左上），当格列卫与 IL-3 同时加入时，细胞继续生长，表明 IL-3 为基础的生长机制对格列卫的抑制作用并不敏感。将表达癌蛋白 Bcr-Abl 的质粒转入这些细胞后，BaF3 细胞即使在没有 IL-3 存在的情况下也能继续增殖（左侧），表明 Bcr-Abl 能代替 IL-3 维持细胞生长。然而，向这些依赖 Bcr-Abl 才能生存的细胞中加入抑制 Abl 激酶浓度的格列卫则可以杀死这些细胞。但向维持在 IL-3 中的表达 Bcr-Abl 细胞中加入格列卫并不影响细胞的生存（表明只要 BaF3 细胞继续接受 IL-3 刺激，格列卫就不能对细胞产生毒性）。因此，在 IL-3 缺乏的情况下，表达 Bcr-Abl 的细胞可用于筛选格列卫及类似作用于 Bcr-Abl 的药物的作用，并且有很高的敏感性和特异性。(B) 图 A 的信息可用来发展一种分析系统，即用 BaF3 细胞悬液的光密度来表示特定处理后生存的 BaF3 细胞的数量（纵坐标）。IL-3 存在时，无论 BaF3 细胞内是否表达 Bcr-Abl 癌蛋白（绿色点），格列卫均不能对细胞的生存产生作用。但当 IL-3 缺乏时，2μmol/L 浓度的格列卫就能强烈抑制表达 Bcr-Abl 的细胞的生存。CML 患者中存在一种 Bcr-Abl 的突变体，它对药物治疗有很强的抵抗作用。如果在使用格列卫治疗前就从患者体内克隆到这一突变体，而不是“野生型”Bcr-Abl 癌蛋白，就需要使用很高浓度的格列卫才能杀死这些细胞（蓝色点）。最后一条曲线是重新检测了培养基中缺乏 IL-3 时细胞的生长情况。(Courtesy of M. Azam and G. Q. Daley.)

素 3(interleukin-3，IL-3）才能维持生存和增殖。但如果细胞的 Bcr-Abl 癌蛋白异常表达后，细胞可以不依赖于 IL-3 而生存。随后将这一修饰细胞在无 IL-3 存在下（使其完全依赖于持续激活的 Bcr-Abl）暴露于拮抗 Bcr-Abl 癌蛋白的不同候选药物，然后分析细胞的增殖与生存情况（图 16.16B)。

设计这类细胞学试验的目的是确定待测药物是否能诱导细胞凋亡或使细胞静止（阻碍细胞增殖），或是根本没有作用。如果该药物确实能引起预期的反应，那么下一个问题就是它引起反应的浓度是否在一个合理范围内。

这类细胞学试验的结果很少能预计到，许多高度疏水的化合物由于很难溶解以至于不能在培养细胞中达到一定浓度而无法进行此类试验（见补充材料表 1 ◎)。而它们的亲水性较强的化学类似物的溶解度虽然很高，能作用于纯化 Bcr-Abl 蛋白，但它是否能穿过细胞浆膜还是个问题。这些化学类似物很可能由于无法在细胞内达到发挥作用的浓度而无法使用。

如果能成功越过这些障碍，使候选治疗药物能在纳摩尔浓度下抑制 Bcr-Abl 依赖的细胞增殖就好了。由于生物选择性的特点，虽然候选药物能作用于这些细胞，但并不排除它也能影响这些细胞或其他细胞内许多激酶的选择性，而这些激酶中有一些可能对细胞代谢来说是非常重要的。

因此，下一步需要确定由其他酪氨酸激酶驱动细胞生长的肿瘤细胞是否也对格列卫之类的抗 Bcr-Abl 药物作用同样敏感，以及格列卫之类的候选药物是如何影响完全正常培养的细胞的。如果幸运的话，可能会得到较高的治疗指数。例如，能杀死 Bcr-Abl 依赖细胞的药物浓度在生长于 IL-3 的同样细胞或由其他酪氨酸激酶癌蛋白驱动生长的其他肿瘤细胞可能没有明显的作用。这便对开发只攻击肿瘤而不对正常组织产生明显副作用的药物带来了希望。如果这些试验中得到了较好的结果，则进一步鼓励开发者进行下一步工作——在体内的细胞和组织水平评价药物的细胞生物学作用。

16.7 实验动物的药物作用研究是临床前试验的重要部分

一旦发现候选的抗肿瘤药物具有较强的杀伤体外培养细胞的能力，药物的开发过程便不可避免地进入下一步骤——检测它是否能杀伤体内肿瘤团块中增殖的肿瘤细胞。如果理想的话，药物的体外行为将能预测它的体内作用。在这里，又出现了新的问题，其中一个就是我们在 13.10 节里遇到的实验结果产生的。在那部分内容里我们知道了肿瘤对放射治疗的敏感性不是由肿瘤团块中的肿瘤细胞本身决定的，而是由肿瘤中的血管上皮细胞对放射的敏感性决定的。一些药物可能以同样的方式作用于肿瘤的基质细胞，而不是肿瘤本身（这在体外实验中是无法观测到的)。除了这些情况，基质细胞还能产生某些类型的抗凋亡信号（如 IGF-1)，而同样数量的肿瘤细胞中并不产生 IGF-1。从更广泛的意义上讲，肿瘤细胞与肿瘤相关基质细胞的异源性相互作用的复杂性表明药物对体外培养的纯化肿瘤细胞增殖的反应通常并不能代表药物在体内对肿瘤生长的作用。

由于人和啮齿类动物的细胞生物学差别很大（11.12 节)，所以候选抗癌药物的体内检测几乎总是使用人的（不是鼠的）肿瘤细胞在鼠的身上生长。这一做法的前提是假设免疫缺陷的鼠身上形成的人的肿瘤移植物的行为与肿瘤学家们在患者身上见到的肿瘤

十分相似。

但这就又提出了更具挑战性的问题。用于产生移植瘤的肿瘤细胞是从肿瘤细胞系扩增来的，它们已经在培养基中作为纯化群体扩增了许多年，甚至是几十年。美国国立癌症研究院（National Cancer Institute）建立了 60 个这样的肿瘤细胞系，作为在美国评价候选抗肿瘤药物的标准材料。这些细胞系中的许多已经不能代表临床中遇到的肿瘤了，因为它们来源于更能适应体外扩增培养条件的恶性程度较高的人类肿瘤（见图 16.17）。其他肿瘤细胞系在培养过程中几乎不可避免地产生了远不同于最初来源于切除肿瘤的祖先细胞的特性。实际情况确实是这样，这些细胞为达到优化扩增所经历的体外条件与生活在体内的条件有巨大的差异。

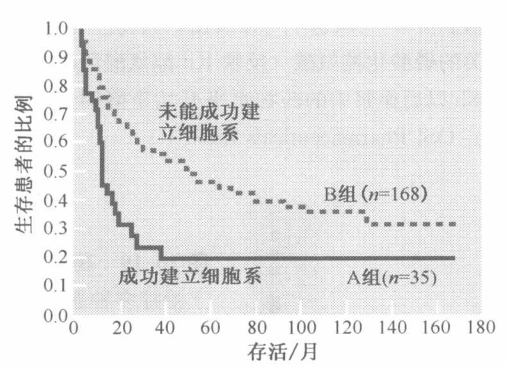


图 16.17 代表人类肿瘤的癌细胞系 许多研究者试图从人肿瘤中分离出癌细胞使其适应体外培养，以建立癌细胞系。他们的经验更多的认为只有恶性程度很高的肿瘤细胞才能体外扩增，产生肿瘤细胞系。这一观点在一项为期 12 年的广泛研究中得到了证实。在这项研究中，对 203 例食管癌患者的癌细胞进行了体外培养。其中只有 35 例能够建立体外培养的细胞系（约占肿瘤数量的 17%）。这组（A 组）患者的临床情况（红色线）比没能建成体外培养细胞系的一组（B 组，蓝色）的临床情况差得多。该图表说明了为什么来源于已建成癌细胞系的移植瘤常常不能代表临床遇到的典型肿瘤的特性（因为癌细胞系常来源于晚期肿瘤，它们的恶性程度是最高的）。(From Y. Shimada, M. Maeda, G. Watanabe et al., Clin. Cancer Res. 9：243-249，2003.)

这些事实有助于解释为什么用人类移植瘤来预测患者的肿瘤对药物的反应是相对不准确的，甚至在有些情况下是有疑问的。例如，胰腺癌来源的肿瘤细胞经过了先前几十年的体外传代过程是否还能反映胰腺癌的生物学行为？或者它在某个实验室经过了几十年的传代过程中是否受到了结肠癌或乳腺癌细胞的污染？但到目前为止，这一很不完美的移植瘤模型仍然是我们所能获得的最好的实验材料。这一模型在未来的近期时间内还不可能被其他人癌动物模型所替代。

药物动力学（PK）是代表药物的体内疗效的一个关键因素：药物是否能在用药后一段时间在血浆或组织内积累到一定水平；它是否只能在体内瞬时存在，进入循环后几分钟就被肾脏排泄；它是否能抵抗快速或其他的药物代谢系统，如第 12 章提取的细胞色素 P450(Cyp) 将其转化成无毒的分子（图 16.18）（经常测量的一个关键的药物动力学参数是“曲线下面积”，或称为 AUC，是通过对随时间而改变的药物浓度进行积分运算而得到的。AUC 被认为能反映肿瘤细胞内的累积药物剂量）；以及它是否能经口服，而不需注射使用。

实验动物只能为药物代谢提供较粗糙的提示，而无法准确预测人类如何代谢并排泄各种药物。而且，我们已经知道（信息栏 12.5），包括药物在内的不同化合物的代谢或排泄的速度在不同的人之间的差异是很大的（见图 16.19）（在一些药物公司可能会在研究它在移植瘤的治疗疗效前先检测候选化合物的药物动力学。那些在动物实验中药物动力学很差的药物通常会停止进行下一步的实验。由于啮齿类动物与人类的药物代谢和排泄差别很大，排除这类药物在个别情况下会显得为时过早）。

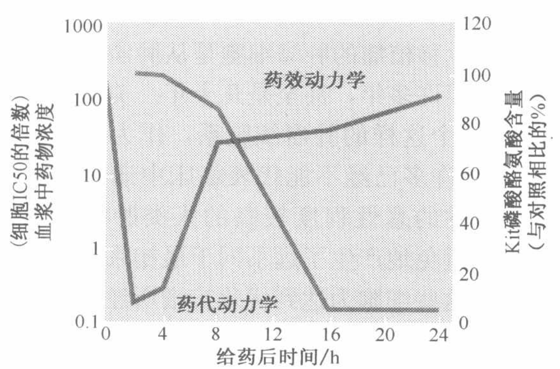


图 16.18　格列卫的药代动力学和药效动力学　药物的代谢动力学代表着它在血浆中累积和清除的动力学，因此它能为实验动物研究或肿瘤患者治疗中使用的药物浓度提供很好的提示。对数坐标（左侧纵坐标）线图表示的格列卫的血浆水平在药物注射入小鼠体内后波动很大（蓝色曲线）。它的浓度表示的是已知抑制 50%Kit 受体的酪氨酸激酶活性时的多个浓度（即药物的 IC50）（Kit 生长因子受体的酪氨酸激酶结构域也是格列卫的抑制位点）。从这里可以看出，药物注射后 1h，移植的人肥大细胞白血病细胞表达的与 Kit 受体相关的磷酸化酪氨酸（反映 Kit 酪氨酸激酶活性）的水平减少到了最初水平的 1%以下。但药物注射 8h 以后血浆中的药物水平开始下降时其磷酸化酪氨酸水平开始反弹。(Courtesy of D. L Emerson，OSI Pharmaceuticals Inc.）

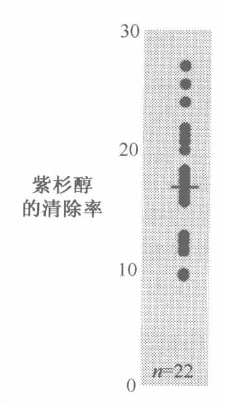


图 16.19　药物清除的个体间差异　紫杉醇（paclitaxe）是可用于治疗多种恶性肿瘤的化疗药物，它的作用机制是稳定微管从而干扰细胞通过 M 期。从图中可以看到，在研究的 22 例卵巢癌患者中，初始注射后药物从血浆中清除的相对速率变化范围达 3 倍。这些清除率可能会受到细胞色素 c 影响的代谢速率和肾脏排泄等改变的影响。(From M. Nakajima，Y. Fujiki，S. Kyo et al.，J. Clin. Pharm. 45：674-682，2005.）

实际上，图 16.18 显示了药物的另一特性：药效动力学（PD）。这里显示的是格列卫的药效动力学情况。药效动力学评价的是药物影响接受治疗的肿瘤内的特定生物化学功能的能力。该图中显示的 PD 与实际情况类似，检测了一个针对 Bcr-Abl 功能的代用标记物——Kit 受体的行为。我们会在后面的内容中看到详细说明，Kit 是格列卫影响的几个激酶之一，认为它对药物的反应与 Bcr-Abl 相同。图 16.18 发现 Kit 活性只有在循环中药物浓度最高的时刻才被短暂地抑制。这样的一个短暂抑制只影响了细胞周期的一部分，通常不足以引发诸如杀死肿瘤细胞的生物效应。

在动物实验的过程中，药物可能会表现出在有机体整体的毒性副作用。这些副作用代表着几乎所有现存的肿瘤治疗药物都可能会出现的反应。在杀死肿瘤细胞所需浓度的药物作用下，最常受到毒性效应影响的器官和系统包括肝、肾、消化道和造血系统。这些毒性反应很难用体外组织培养实验中获得的结果来预测，并且即使在如狗、猴、小鼠和大鼠的实验动物身上检测到的毒性反应也不一定能用来预测人对药物的反应。

这一结果使我们又一次将注意力转移到药物的治疗指数上来——与正常组织相比药物影响肿瘤组织的效率。很明显，理想的肿瘤治疗需要很高的治疗指数，最大限度地杀死肿瘤细胞而不影响正常组织。达到这一选择性的主要障碍是肿瘤细胞内所表达的约 20 000 种基因产物中的绝大部分也同时在它们对应的正常组织中也有表达。

动物实验模型的失败使我们预测药物在人类产生的毒性副作用成为一个棘手的问题。经过了大约 8000 万年的独立进化过程，人类和啮齿类已经在代谢方面产生了明显的区别。人类对药物的反应可能远不同于大鼠和小鼠。即使我们最终可能还要将候选药物用于亲缘关系更近的猴子来更加相对准确地预测人类对药物的反应，但两者之间的反应也是有很大的不同。如果药物经过这些检测后没有出现诸多需要引起警惕的反应；它便可作为候选药物进行人体试验了。

16.8 任何新药都必须经过人体内严格的 I 期临床试验后才可能成为具有应用前景的候选药物

前面的讨论解释了为什么将新药的耐受性试验作为在患者体内首次使用时的研究内容。在美国这称为 I 期临床试验。候选药物按照不同的剂量进行研究，监测各种毒性反应，这些剂量中包含了该药可能的治疗剂量。通常这些研究的起始剂量会远远低于可能发生明显毒性的剂量（如动物体内产生毒性剂量的 1/10），然后在一系列患者中逐步增加治疗剂量，直到出现不可耐受的毒性。通过这种剂量爬坡获得药物的最大耐受剂量（MTD），指导进一步研究中确定治疗剂量。皮疹或一过性恶心等副作用一般可以耐受，不会影响药物的进一步开发；但是也有一些副作用，如重度的腹泻或骨髓抑制，可能使患者难以承受，甚至威胁生命，这些副作用就可能促使我们尽早地放弃对该药的进一步研究。

同先前的动物研究一样，I 期临床也包括药物代谢动力学研究，用以确定药物是否以理想的浓度和足够的时间来作用肿瘤细胞。当然药代研究并不能确定药物是否对肿瘤细胞有效，后者属于药效学研究的范围。图 16.20 显示的是 EGF-R 受体阻滞剂的药效反应（包括单克隆抗体和小分子酪氨酸激酶抑制剂）。研究者希望在 I 期临床试验中也能够确定药物对患者肿瘤表面 EGF-R 受体的治疗作用。为便于监测这种治疗作用，研究者选择了患者皮肤细胞的 EGF-R 受体作为替代靶标，因为在治疗过程中可以随时获得小块的皮肤活检物进行研究。图 16.20A 显示，接受 EGF-R 受体酪氨酸激酶抑制剂治疗的患者，其皮肤中 EGF-R 信号通路被明显抑制，EGF-R 通路下游重要的信号分子——MAPK 激酶的活性也被抑制，表明其下游的有丝分裂信号得到了有效的阻滞。

经过 EGF-R 单抗治疗后的结肠癌患者中，对肿瘤组织活检标本的检测也得到了类似的结果（图 16.20B）。这些类似的药效学检测确保了实施的治疗（此处指一种单抗）能够在预定的靶点达到足够的浓度，并进而下调预定靶点的活性。

然而耐人寻味的是，一些 EGF-R 下游的信号转导蛋白（包括 Akt/PKB 在内）在结肠癌中仅被轻微抑制（图 16.20B），说明肿瘤细胞内存在激活这些信号分子的其他途径。因此，药效学检测固然确保了有效治疗的前提——确保治疗药物到达靶细胞和靶分子，但是并不能保证治疗肯定成功，还有一些其他因素可能会影响到治疗的效果。

将最大耐受剂量（MTD）、药代动力学（PK）和药效学（PD）检测联合分析，就可能确定出药物的治疗窗——一个浓度范围，既高于药物发挥作用的最低必要浓度，也不能超出最大耐受剂量（图 16.20C）。事实上，我们希望药物治疗窗的浓度范围比较大，这样才能保证临床医生使用该药时能够因时因人灵活地调整药物剂量。如果治疗窗

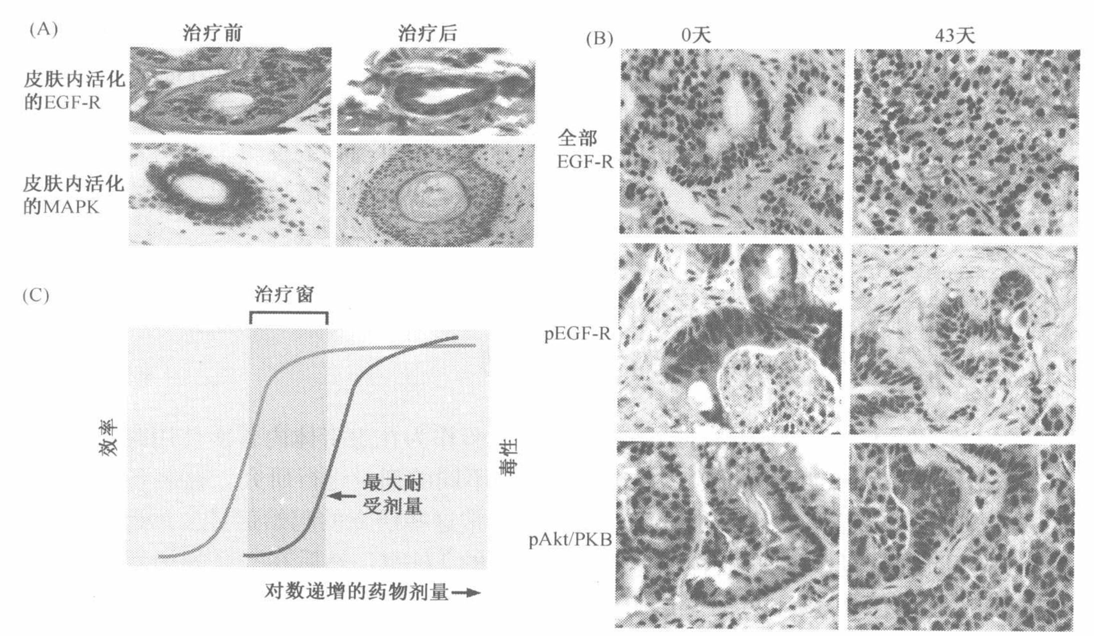


图 16.20 药效学检测和治疗窗的确定 理论上可以通过检测药物对皮肤组织中 EGF-R 的作用来衡量肿瘤组织中 EGF-R 受体被抑制的程度，而且皮肤组织很容易通过活检获得。此处显示了一些治疗病例，患者罹患的肿瘤包括卵巢癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和头颈部癌。(A) 一例易瑞沙治疗后肿瘤患者的疗效，易瑞沙是一种小分子 EGF-R 受体酪氨酸激酶抑制剂（见图 16.29）。上面一组显示的是磷酸化 EGF-R 抗体的免疫组化结果（棕色），磷酸化 EGF-R 是该受体的活化形式。下面一组采用的抗体是磷酸化的 MAPK 抗体，也是 MAPK 激酶的活化形式。所有免疫组化参照的是毛囊角质细胞正常的信号强度。(B) 通过结肠癌活检组织免疫组化检测来确定一种 EGF-R 单抗（EMD7200）的疗效。在该病例中发现，长期治疗对 EGF-R（棕色）的整体水平抑制有限，但是对磷酸化（即活化形式）的受体（棕色，pEGF-R）有很强的抑制作用。对活化的磷酸化 Akt/PKB 的抑制作用也有限。患者接受该抗体治疗后的疗效仅为部分缓解，这也可能与肿瘤细胞中 Akt/PKB 活性未被完全抑制有关。(C) 通过这些药效学检测方法，以及药代动力学和毒性的研究，就可以确定出药物的治疗窗——也就是产生疗效但不会产生超出耐受程度的毒性的药物浓度范围。(A and B. courtesy of J. Baselga.)

过于狭小，就可能限制将来试验药的临床应用。

I 期临床的受试者往往是数量有限的志愿患者，现有治疗方法已经对他们无效，通过试验药物反而可能在一定程度上使得肿瘤消退或者生长受到抑制，但是患者获益的前提是能够耐受毒性反应。而且在 I 期临床研究中即便是看到了治疗有效的苗头，其结果也不具备统计学的意义，不能得出药物疗效的权威结论。事实上，I 期临床试验的真正目的在于发现不可预料的毒性和确定耐受剂量。

16.9 II 期和 III 期临床试验探寻临床治疗的确切适应证

一旦 I 期临床试验确定候选药物的毒性是可以耐受的，就推动了 II 期临床试验的开展，用以评价药物的疗效。这阶段就需要纳入更多的肿瘤受试者。此时第一次需要在临

床研究中确定严格的入组标准，即该研究需要募集哪种类型或者哪一期别的肿瘤患者。

药物临床适应证的确定通常比较简单，例如我们前面提到的一种针对 Bcr-Abl 的靶向药物，就应该在慢性粒细胞白血病（CML）患者中验证其疗效。另一种针对 HER2/Neu 受体的药物，就需要在该受体过表达的乳腺癌患者中验证疗效，这类患者约占全部乳腺癌的 30%。还有一种针对 Raf 激酶的抑制剂，其疗效可以在晚期黑色素瘤患者中加以验证，因为这类患者通常（占 70%）存在 B-Raf 激酶的突变和持续激活。然而有趣的是在最后一个例子中，另一种 B-Raf 抑制剂单独使用并不能有效地抑制转移性黑色素瘤的增殖，但是与化疗药物联合使用时，却能获得神奇的疗效。

当然，也有些药物难以确定最佳或最合理的临床适应证。例如，凋亡诱导药物可能对多种肿瘤细胞均有效，如何选择这类药物的适应患者人群？直接抑制 Akt/PKB 激酶抗凋亡活性的药物，如何选择适应患者？抗 EGF-R 受体的药物是否可以用于所有高表达该受体的肿瘤（补充材料 51 ◎）？我们在本章节后面会提到，某些肿瘤在常规遗传学或分子生物学方法筛选时并不被认为是某种药物的适应证，然而实际上这些肿瘤恰恰对该药特别敏感，这些药物的治疗价值常常是被无意中发现的。

（过去许多 II 期临床试验选择肿瘤适应证时很武断，如果在研究方案设计时就不幸选错了适应证，就可能因此错过很多真正有效的候选药物。例如，一种药物治疗胃癌时可能疗效奇特，但是由于没有意识到这一点，II 期临床研究被用于治疗胰腺癌或者肺癌，结果疗效不佳，就放弃了进一步的研究和临床验证）。

如果在 II 期临床试验中看到了候选药物治疗某种肿瘤有效的迹象，就会在更大宗的患者人群中开展 III 期临床试验。尽管这些研究花费巨大，但是一旦成功，就会第一次在真正意义上显示该药物的临床疗效。只有在大样本的患者人群中同时使用另一种治疗方法作为对照，才可能使得新药治疗的结果更加有价值。选择的对照治疗通常是已经批准并且在临床广泛使用的治疗方法。重要的是，通常只有当新药治疗获益超过现有标准治疗时，候选药物的特定治疗适应证才会获得批准［在美国由国家食品药品监督管理局（FDA）批准］。

参加 III 期临床试验的患者往往已经接受过多种细胞毒药物的多程化疗，每次化疗的结局都是复发，再次出现的肿瘤已经对现有治疗耐药（没有疗效或疗效不佳）。这些肿瘤的恶性度也往往更高。了解受试患者的这些特点，我们就不难理解为什么 FDA 在批准一个新药或者新方案时设立的门槛并不高，因为在 III 期临床试验中药物治疗的都是一些非常难治的肿瘤，可能只是患者生活质量的改善或者肿瘤暂时的缩小就足够批准上市了，并不一定要提高远期生存。

当前胰腺癌治疗的发展就是这样一个例子。当然胰腺癌是一个比较极端的例子，这种肿瘤的 5 年生存率（从初次诊断起）始终不超过 4%。吉西他滨（双氟胞苷）目前已经广泛应用于胰腺癌的治疗，但是 FDA 最初批准该药治疗胰腺癌的依据仅仅是某些患者治疗后症状的改善、体重的增加，以及肿瘤生长的短暂控制，其实生存时间的延长并不显著：吉西他滨治疗组患者中位生存 5.65 个月，氟尿嘧啶（5-Fu）标准治疗组中位生存 4.41 个月（图 16.21）。除此以外还有很多类似的例子，这也说明实体瘤的治疗多么迫切需要真正有效的方法。通过这个例子我们还发现，FDA 对于抗肿瘤药的批准要比其他药物宽松，在其他疾病中需要获得更显著的疗效时才会批准一个新药上市。

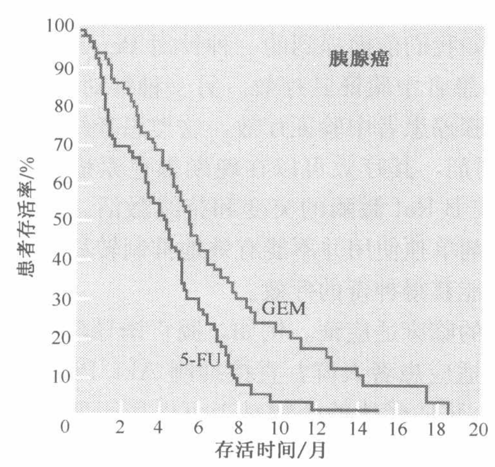


图 16.21 吉西他滨治疗胰腺癌 该 Kaplan-Meier 生存曲线说明了胰腺癌的死亡率很高。吉西他滨（GEM）治疗患者的存活时间仅仅稍长于 20 世纪 90 年代氟尿嘧啶（5-Fu）治疗的患者。这两种药物都是嘧啶衍生物，主要通过 DNA 内错配干扰 DNA 合成（5-Fu 还能干扰嘌呤的生物合成）。尽管该项发表于 1997 年的研究仅仅显示出吉西他滨治疗组很有限的生存提高，但这一结果也足以使得吉西他滨获得 FDA 的批准上市。（Form H. A. Burris 3rd，M. J. Moore，J. Andersen et al.，J. Clin. Oncol. 15：2403-2413，1997.）

尽管这些要求相对宽松，但是由于药物研发过程中其他因素的影响，目前抗肿瘤药物的研发成功率仍然很低。可能一百个新药中，只有一个药物能够从最初的体外研究一直坚持到最后 III 期临床中证实对某种患者有效，并且最终获得 FDA 的批准上市（批准上市后可能还会在更为广泛的人群中开展 IV 期临床研究，比较该适应证中新药与其他药物的疗效差异，进一步确定对该药有效的亚群患者，以及进一步评价该药在临床广泛应用后的安全性）。

16.10 肿瘤通常会对初始有效的治疗产生耐药性

HER2/neu 转基因小鼠的行为阐明了所有抗肿瘤药物面临的一个难题。在转基因小鼠体内，突变后具有致癌能力的转基因能够按照预定程序诱导乳腺癌的发生，并可以在肿瘤发生之后被关闭。转基因诱导的原发乳腺癌和转移病灶在 *HER2/neu* 基因关闭后出现全面回缩，然而大部分小鼠在 1～9 个月后又发生了新的肿瘤（见表 16.1）。新发肿瘤明显表现出了不同于先前的特性，出现了其他促进肿瘤生长的途径。也就是说，它们的生长不再依赖于癌基因 *HER2/neu* 的表达。

正如在第 12 章中所述，不稳定、易突变的癌细胞基因组会持续产生新的等位基因和新的遗传表型。进化中的癌细胞能够从这些遗传突变中挑选出能够提高自身存活和增殖能力的突变组合。在上述 *HER2/neu* 的例子中，癌基因关闭后存活下来的少数癌细胞需要经过数个月时间，等待自身的基因组重新出现一个癌基因（或其他能够导致肿瘤的等位基因），以重新开始侵袭性增殖过程。极少数能够获得这种新的基因突变的细胞将开始克隆性增殖，最终导致肿瘤的复发。

类似原因导致了所有的癌症治疗措施都变得更为复杂。最初临床治疗使肿瘤细胞数目减少，但通常都跟随着因肿瘤耐药而出现的复发，肿瘤细胞通过某种途径对最初有效的治疗方式产生耐药性，从而通过新的方式获得存活。

例如，目前化疗中常用的细胞毒药物对多种人类常见肿瘤（包括乳腺癌、小细胞肺癌和卵巢癌）都十分有效，但是不久之后，肿瘤就如前所述对药物治疗产生了耐药性并出现复发。这种获得性耐药的产生主要是由于癌细胞在遗传表型上的改变。

获得性耐药的产生机制多种多样，这表明癌细胞在逃避化疗药物的杀伤作用时存在多种调节机制。如表 16.2 所示，这些机制包括使药物分子通过浆膜的转运能力的丢失，以及产生将药物泵出浆膜的能力等。其他还包括获得了代谢药物的能力，其中部分就是通过降解进入胞内毒性化合物的酶发挥作用（12.6 节）。细胞还能够中和药物，使之成为无效结构，或加速被化疗药物或放射线破坏的 DNA 分子的修复。

表 16.2　肿瘤耐药机制的例子

耐药机制	例子
A 基于肿瘤细胞的机制	
细胞内药物浓度降低	多种药物的外排泵——P 糖蛋白的过表达
药物活性降低	细胞色素 P450 表达丢失导致药物原型的代谢活性降低
药物或毒性中间产物的失活加快	使核苷类似物失活的腺苷脱氨酶（nucleoside deaminase，ADA）的增加；谷胱甘肽-S-转移酶（glutathione-s-transferase，GST）解毒能力的增强
对药物导致的损害的修复能力增强	对化疗药顺铂引起的 DNA 交联的修复能力增强
对药物导致的毒性的抵抗能力增强	Bcl-2 过表达或 p53 突变导致凋亡过程的失活
药物靶点改变（量变或质变）	Bcr-Abl 的过表达，Bcr-Abl 催化部位的改变
B 宿主依赖性机制	
解剖学上的药物屏障（肿瘤避难所）	血脑屏障下肿瘤在颅内生长，或肿瘤在睾丸内生长
宿主-药物相互作用：药物在正常组织中的失活增加	肝脏对环磷酰胺等化疗药物的解毒功能
宿主-药物相互作用：正常组织活化药物的能力降低	肝脏活化环磷酰胺的能力降低

摘自 J. Moscow，C. S. Morrow and C. H. Cowan，in J. Holland and E. Frei（eds.），Drug Resistance and Its Clinical Circumvention in Cancer Medicine，6th ed. Hamilton，ON：B. C. Decker，2003.

这些行为对所有的抗肿瘤治疗都提出了挑战。唯一可能的解决办法取决于这样一个事实：多数耐药机制在癌细胞中的发生率相对较低。因此，如果同时使用两种不相关的药物，肿瘤细胞能够存活的概率就相当于单药耐药概率的平方，而三药联合治疗时的存活概率就相当于单药耐药概率的三次方，依此类推。

然而，即使是多药联合治疗，癌细胞依然能够通过各种方法逃避杀伤作用，比如多药耐药机制（MDR）的获得。例如，编码一种跨膜药物泵蛋白的 *MDR1* 基因的高水平表达使癌细胞能够将各种结构不相关的化疗药物排出到细胞外，从而使细胞内的化疗药物浓度大大降低到了亚毒性水平（图 16.22）。同样的，细胞凋亡途径上的某些部分的失活也会导致对一系列不同化疗药物的同时耐药。排除上述因素，在抗肿瘤药物的发展上已经达成了一种共识，无论是小分子药物还是生物分子药物，在单药治疗的情况下无法治愈绝大多数的癌症，必须依靠多种有效药物的联合应用才能获得有效并持久的治疗手段。

在上述前提下，我们在这一章将会进行一系列阐述，每一部分都会谈到一类化疗药物以及它在癌细胞内的作用靶点。我们会从经典的药物开始，最后将会谈到那些理论上有效但是还没有经过临床验证的药物。其中，某些药物的产生源自于使癌细胞内某种蛋白的失活，这些药物的发展过程有很大的逻辑性和规律性。而另一些药物的开发，可能是来源于某种突发的灵感或者是某个意外的惊喜。不可避免地，这只是对目前正在研究

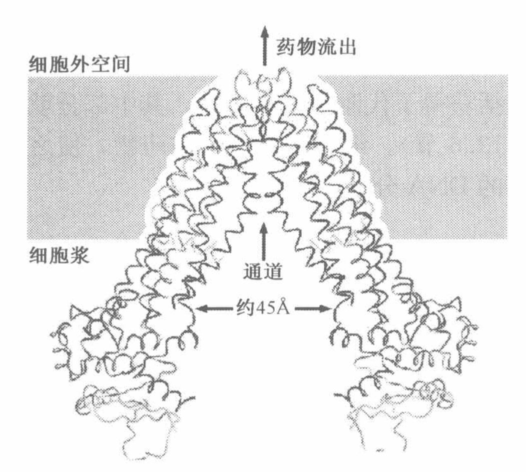


图 16.22 多药耐药和 P 糖蛋白 接受各种化疗的癌细胞内经常可以发现 MDR1 基因编码的 P 糖蛋白水平增高。P 糖蛋白是一个 170kDa 的 ATP 依赖性跨膜蛋白，能够把多种药物泵出细胞外，其结构如图所示。它是膜转运分子大家族的成员之一，这一家族目前已知有 49 个成员。P 糖蛋白可能是人类多种肿瘤对小分子化疗药物产生获得性耐药的原因所在。(From D. Mahadevan and A. F. List, Blood 104: 1940-1951, 2004.)

中或应用中的众多药物的一个有选择性的简要的概述。它们只是在以后数年中将会被研发并批准应用的许多药物的先行者。

16.11 格列卫的开发为多种高度靶向治疗药物的发展奠定了基础

在上一章，我们复习了关于 Bcr-Abl 癌蛋白以及针对它进行的实验性治疗的文献。现在，我们将对 Bcr-Abl 癌蛋白的历史进行一次回顾，包括 Bcr-Abl 癌蛋白如何被发现、被证实是一个有效的药物作用靶点、最终成为新药研究开发的作用靶标的整个过程。这一故事的价值就在于揭示了药物开发从最初的实验室发现到应用于肿瘤临床的漫长过程。

这个故事开始于 1914 年，德国细胞学家 Theodor Boveri 提出假设认为染色体缺陷可能会导致细胞的异常增殖，从而最终发展成为某种类型的癌症。此后过了大约半个世纪，Boveri 的设想才得到了验证。1960 年，费城的两位细胞学家注意到大多数慢性髓细胞性白血病（chronic myelogenous leukemia，CML）细胞中都特异性地存在着一种异常的短小的 22 号染色体。这个染色体从此被命名为费城染色体（Philadelphia chromosome）或简称为 Ph^1。又过了数十年，芝加哥的一位研究者证实，Ph^1 染色体是由于 9 号染色体和 22 号染色体易位形成的（最早见于 4.6 节）（由于 22 号染色体易位到 9 号染色体的片段大于从 9 号染色体易位到 22 号染色体的片段，使得原来就很小的 22 号染色体变得更为短小；22 号染色体的残余部分加上易位过来的小片段构成了 Ph^1，见图 16.24A）。这一体细胞突变导致的染色体变异被认为是该疾病的潜在病因。如前所述，95%以上的 CML 中存在着这种特异性的染色体易位。

此后十几年，人们仍然对这一染色体易位产生的融合基因一无所知。直到 1982 年，分子生物学家发现小鼠 *c-abl* 原癌基因的人类同源基因 *ABL* 直接参与了这一染色体易位过程，并在易位后与某个未知基因发生了融合。此后不久，研究发现这个未知基因的断点（与 *ABL* 基因相融合的染色体位点）分散在几 kb 长的一段 DNA 上，因此这一区域被命名为断裂点簇集区（breakpoint cluster region），简称为 *BCR*。实际上，C 端的 Abl 蛋白与 N 端不同大小的 Bcr 蛋白构成了三种不同的融合蛋白。如图 16.23 所示，不

同的融合蛋白各自与不同类型的白血病相关。

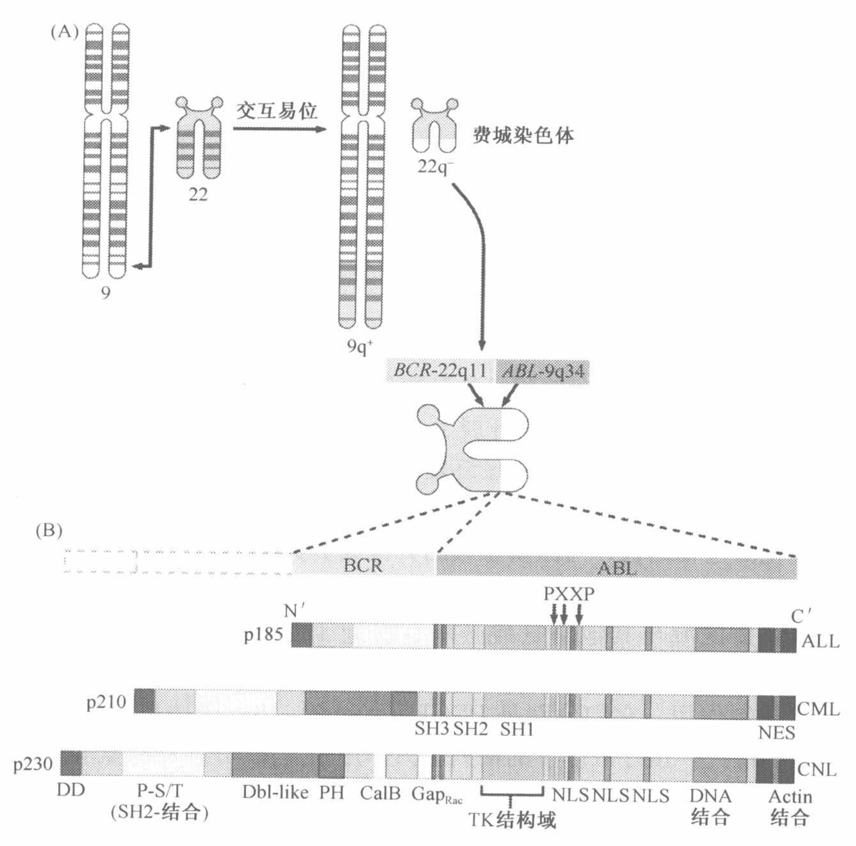


图 16.23 Bcr-Abl 蛋白的起源和结构 (A) 95%以上的慢性髓细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia，CML)中存在着费城染色体，它由 9 号染色体和 22 号染色体易位形成。携带了大部分 *ABL* 基因的 9 号染色体 q34 区域易位到 22 号染色体的 q11 区域，而 22 号染色体原有的较大片段则易位到了 9 号染色体上。易位导致了 22 号染色体变短(例如，22q-)形成费城染色体(ph^1)，*ABL* 基因的 5′端和一般位于 22q11 的 *BCR* 基因的 3′-近端发生融合。(B) 根据 *BCR* 断点的精确位置，共有三种不同的 Bcr-Abl 融合蛋白，它们分别见于 ALL(急性淋巴细胞性白血病，acute lymphoblastic leukemia)、CML(慢性髓细胞性白血病，chronic myelogenous leukemia)和 CNL(慢性中性粒细胞性白血病，chronic neutrophilic leukemia)。每个 *BCR-ABL* 融合基因编码一个多区域(多功能)的融合蛋白。(From A. S. Advani and A. M. Pendergast, Leuk. Res. 26：713-720，2002.)

在此后的两年内，Bcr-Abl 蛋白被发现具有活化的酪氨酸激酶作用。在这一点上，它的功能与 Abelson 小鼠白血病病毒的 Abl 癌蛋白类似。这一反转录病毒的基因组携带着一个 *abl* 癌基因，它来源于正常小鼠体内相关的原癌基因。

1990 年，一段编码 Bcr-Abl 融合蛋白的 cDNA 被引入一个反转录病毒载体。结果表明，含有这个 cDNA 片段的病毒能够在小鼠体内诱导出与人类 CML 非常类似的一种白血病。患病小鼠的血液中同样存在着大量分化良好的粒细胞。在某种条件下，小鼠白血病也会和人类白血病一样发展至“急变期”(blast crisis)，表现为淋巴系统和髓系内

聚集大量的幼稚细胞（见图 12.4）。上述研究结果为证实 Bcr-Abl 融合蛋白是 CML 白血病形成过程的中心动力提供了最早的可靠证据。

不幸的是，这个关于 Bcr-Abl 关键作用的阐述并没有揭示它的作用机制。组成 Bcr-Abl 蛋白的两个蛋白分子的各个结构和功能区域的不同排列方式揭示了 Bcr-Abl 复杂的信号转导途径（见图 12.4B）。这些区域使 Bcr-Abl 融合蛋白能够活化 Ras 通路，PI3 激酶-Akt/PKB 通路，Jak-STAT 通路和 Jun、Myc、NF-κB 等转录因子。此外，它还能激活调控细胞迁移、存活和增殖活性的 Ras 样（Ras-like）Rac 蛋白以及两个非受体类酪氨酸激酶 Hck 和 Fes（图上未标明）。这些过程使 Bcr-Abl 蛋白影响了调控细胞增殖和存活的几乎所有环节。

此外，来源于 Abl 原癌基因蛋白的 Bcr-Abl 酪氨酸激酶区域是白血病形成过程的关键因素。例如，使 Bcr-Abl 蛋白的酪氨酸激酶催化活性失活的微小改变会导致它的转化功能全部丧失。20 世纪 90 年代初期开展了一项旨在开发 Bcr-Abl 蛋白酪氨酸激酶活性的低分子质量抑制剂的研究计划，并最终发现了一种药物——甲磺酸伊马替尼，其他名称还包括 STI-571、Glivec 和 Gleevec（格列卫）（见图 16.10A）。它可以和 Bcr-Abl 酪氨酸激酶的催化部位相结合。与激酶家族的其他成员类似，这一催化部位位于激酶蛋白的两个主要结构域的中间（见图 16.10B）。

虽然 Abl 激酶区域与其他酪氨酸激酶有将近 42% 的氨基酸序列相同，格列卫对 Bcr-Abl 酪氨酸激酶的抑制作用却具有相对特异性。随后，又发现格列卫对其他 4 种酪氨酸激酶也有抑制作用，它们分别是 PDGF（α 和 β）、Kit 受体以及 Arg（Abelson 相关基因）蛋白。因此，治疗浓度下的格列卫只作用于人类 90 多种酪氨酸激酶中的 4 种。和其他激酶抑制剂一样，格列卫分子与 Abl 激酶区域的 ATP 结合袋（ATP-binding pocket）相关（见图 16.15）。但是格列卫并不像其他激酶抑制剂一样通过这个裂口部位阻断 ATP 的结合，而是与激酶结合使之处于一个没有催化活性的稳定构型。

格列卫的成功促进了在小分子激酶抑制剂研究领域的更多尝试。这一类药物与单克隆抗体相比具有一定的治疗优势（表 16.3）。此外，它还促使药物学家尝试开发相对窄谱的酪氨酸激酶抑制剂，其中的一些药物表现出了突出的特异性（补充材料 52 ◎）。

表 16.3　抗受体抗体和小分子酪氨酸激酶抑制剂在肿瘤治疗中的优缺点[a]

	小分子	抗体
靶点	酪氨酸激酶区	受体的细胞外功能区
特异性	+++	++++
结合能力	大多数很快可逆	内在受体，缓慢再生
给药方式	口服，每日	静脉给药，≤每周一次
组织内的分布	较完全分布	不完全分布
毒性	皮疹、腹泻、肺炎	皮疹、过敏
抗体介导的细胞毒作用	无	可能有

a Courtesy of N. J. Meropol and from N. Damjanov and N. Meropol, Oncol. (Huntington) 18: 479-488, 2004.

1996 年体外实验发现格列卫能够在不影响正常骨髓细胞的前提下抑制 CML 细胞的生长。更为特异的是，在药物浓度低至 40nmol/L 的情况下，Bcr-Abl 依赖性细胞的增

殖仍然能够被抑制，这表明格列卫与酪氨酸激酶区域的催化部位具有高度的亲和性（格列卫抑制了 Abl 激酶功能后，Bcr-Abl 依赖性细胞会被强制进入凋亡程序）。最早的临床试验开始于 1998 年，结果表明，31 例接受格列卫治疗的 CML 患者全部获得了疾病缓解，每天服用持续很多年的情况下也只有轻微的副作用。4 年后共有 6000 例患者参加了格列卫临床试验。

格列卫治疗早期（慢性）CML 可以获得 90%的血液学缓解率：血涂片镜检提示血细胞构成发生了明显的变化（图 16.24A），PCR 分析表明血细胞内的 *BCR-ABL* mRNA 水平明显下降（图 16.24B）。这些患者中，50%患者的白细胞染色体核型分析无法再检测到易位的 ph'染色体。已经进展至急变期的患者中 60%经格列卫治疗有效，但是通常在几个月后出现复发。最初的研究表明，慢性期患者接受治疗后平均每年约有 10%出现复发并进展至 CML 急变期；而近期诊断的患者由于多数都处于疾病进程的早期，因此复发率较低，约为每年 5%。

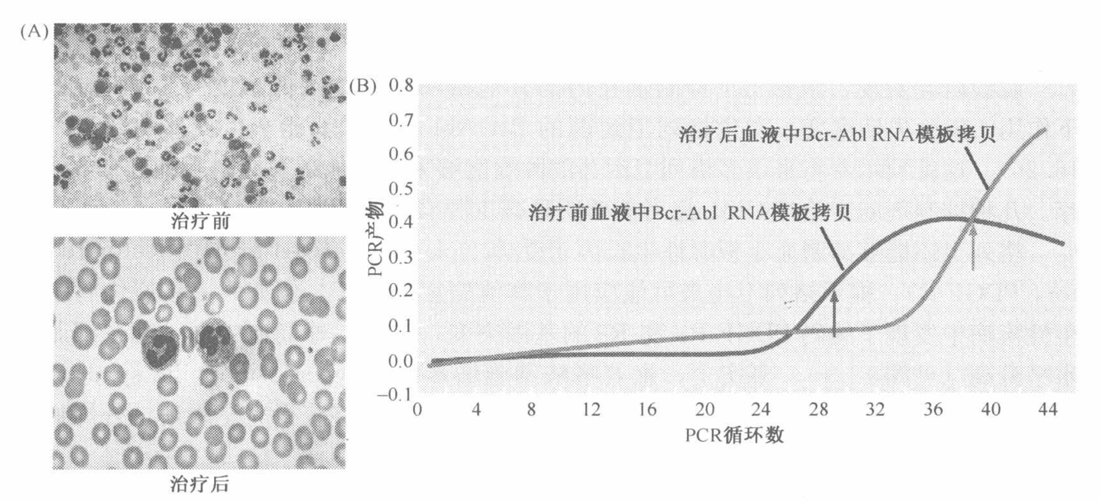


图 16.24　格列卫治疗效果的评价　(A) 格列卫治疗慢性髓细胞性白血病（chronic myelogenous leukemia，CML）的疗效可以通过对患者的血液进行细胞学分析来衡量。如图所示，格列卫治疗前的患者血涂片中可以看到很多白血病细胞（大而深染的核，上图），而治疗后，患者的血涂片中只能看到红细胞和正常的粒细胞（下图）。(B) 用定量 PCR（qPCR）测量 Bcr-Abl mRNA（在 PCR 扩增前进行反转录）的水平是一种更为敏感的定量方法。治疗前的患者（红色曲线），PCR 介导的基因扩增的 50%最大值（红色箭头）出现在基因扩增的第 29 个周期左右（每个周期扩增的序列都会增加一倍）。但是，格列卫治疗后的患者（蓝色曲线），相同的扩增程度出现在第 39 个周期左右（蓝色箭头）。这表明表达 Bcr-Abl RNA 的细胞水平降低了将近 2^{10} 倍。基于 PCR 的分析能够检测出 10^5～10^6 个正常血细胞中的 CML 细胞。(A and B，courtesy of B. J. Druker.)

肿瘤细胞对格列卫的抑制作用产生逃避现象的分子机制十分有趣，由此阐明了 Bcr-Abl 癌蛋白的作用，并揭示了癌细胞对高靶向药物产生获得性耐药的过程。对格列卫耐药患者的癌细胞 *BCR-ABL* 序列的分析结果表明，复发的 32 例中有 29 例 *BCR-ABL* 基因发生了突变，导致激酶区域的 13 个氨基酸发生了替换（其他被归类至下面的研究中）。

其中的一些突变通过直接干扰结合部位或间接地改变立体构型使格列卫无法与催化部位结合。少数患者的格列卫耐药是由于白细胞内 *BCR-ABL* 基因的扩增，导致编码的

癌蛋白水平升高，从而使常规治疗浓度的药物无法产生抑制作用。

这些现象说明格列卫的获得性耐药（表 16.4）通常伴随着 Bcr-Abl 蛋白的结构改变或过表达，从而为证明格列卫的治疗作用来自于它对 Bcr-Abl 蛋白的作用这一结论提供了有力的证据。进一步的研究是在编码 Bcr-Abl 蛋白的基因载体中引入各种形式的随机突变，观察能够对格列卫的抑制作用产生耐药性的突变形式（图 16.25）。这个研究选用了生长和繁殖具有 Bcr-Abl 依赖性的细胞（见图 16.17），研究结果能够从根本上提供对格列卫抑制作用产生耐药性的 Bcr-Abl 结构变化谱，同时还有助于我们将来更好地理解获得性耐药的分子机制。

表 16.4　治疗后的慢性髓细胞性白血病细胞对格列卫反应的变化

	分析的 CML 患者数	Crkl 磷酸化的格列卫 IC_{50} 中位值/(μmol/L)	格列卫 IC_{50} 范围/(μmol/L)
治疗前	6	0.45±0.33	0.21-1.1
复发后	5	7.5±5.2	2.5-14.5

引自 M. E. Gorre，M. Mohammed，K. Ellwood et al.，Science 293：876-880，2001.

后续研究发现，包括 Scr 抑制剂在内的其他激酶抑制剂在低浓度（<10nmol/L）下作用于发生失活突变、产生格列卫耐药的 Bcr-Abl 蛋白，就能产生良好的效果（图 16.26）。这就预示着将来很多格列卫耐药的肿瘤能够采用其他激酶抑制剂进行有效的治疗。几种抑制剂同步治疗 CML 患者能够明显减少肿瘤耐药情况。

格列卫还能够抑制血小板源性生长因子受体（platelet-derived growth factor receptor，PDGF-R），提示格列卫将来可能应用于其他癌症的治疗。例如，一些慢性骨髓增生性疾病中发现了编码 PDGF-Rα 和-Rβ 的基因突变，造成了外周血中某种髓系细胞的水平升高（见图 12.4）。事实上，患有嗜酸细胞增多症（hypereosinophilic syndrome）（骨髓增生性疾病的其中的一种）患者经过格列卫治疗后能够获得完全缓解，外周血中的嗜酸细胞也都降至正常水平。

85%的转移性髓母细胞瘤中都存在着 PDGF-Rβ 过表达，而该肿瘤的非转移性患者中这一现象并不存在。转移性患者的癌细胞生长和增殖更依赖于 PDGF-PDGF-R 自分泌循环。这种疾病多见于儿童，治疗手段局限于放疗，但是放疗常常会带来一些严重的持续性的神经系统毒性。由于多数肿瘤的血管生成过程都在某种程度上依赖于 PDGF 介导的内皮细胞对周围细胞的趋化（见图 13.46）。因此，未来治疗这些实体瘤的方案可能包括格列卫或其他类似的活性药物。

格列卫还作用于另一个酪氨酸激酶——Kit 受体，这使它成为治疗胃肠间质肿瘤（gastrointestinal stromal tumor，GIST）的一种很有希望的药物。GIST 是一种相对少见的肿瘤，没有有效的治疗措施。Kit 受体是 GIST 最常见的突变位点，是促使肿瘤细胞进行有丝分裂的动力（见图 5.18）。在某一项研究中，70%接受治疗的患者出现了肿瘤的退行性变化（见图 16.27）。2005 年，第二个 Kit 酪氨酸激酶抑制剂 SU11248 被 FDA 批准应用于 GIST 的治疗，包括那些对格列卫耐药的 GIST。此外，格列卫（以及其他类似的激酶抑制剂）在肿瘤治疗中的应用可能远不止上述几类肿瘤（补充材料 53 ◎）。

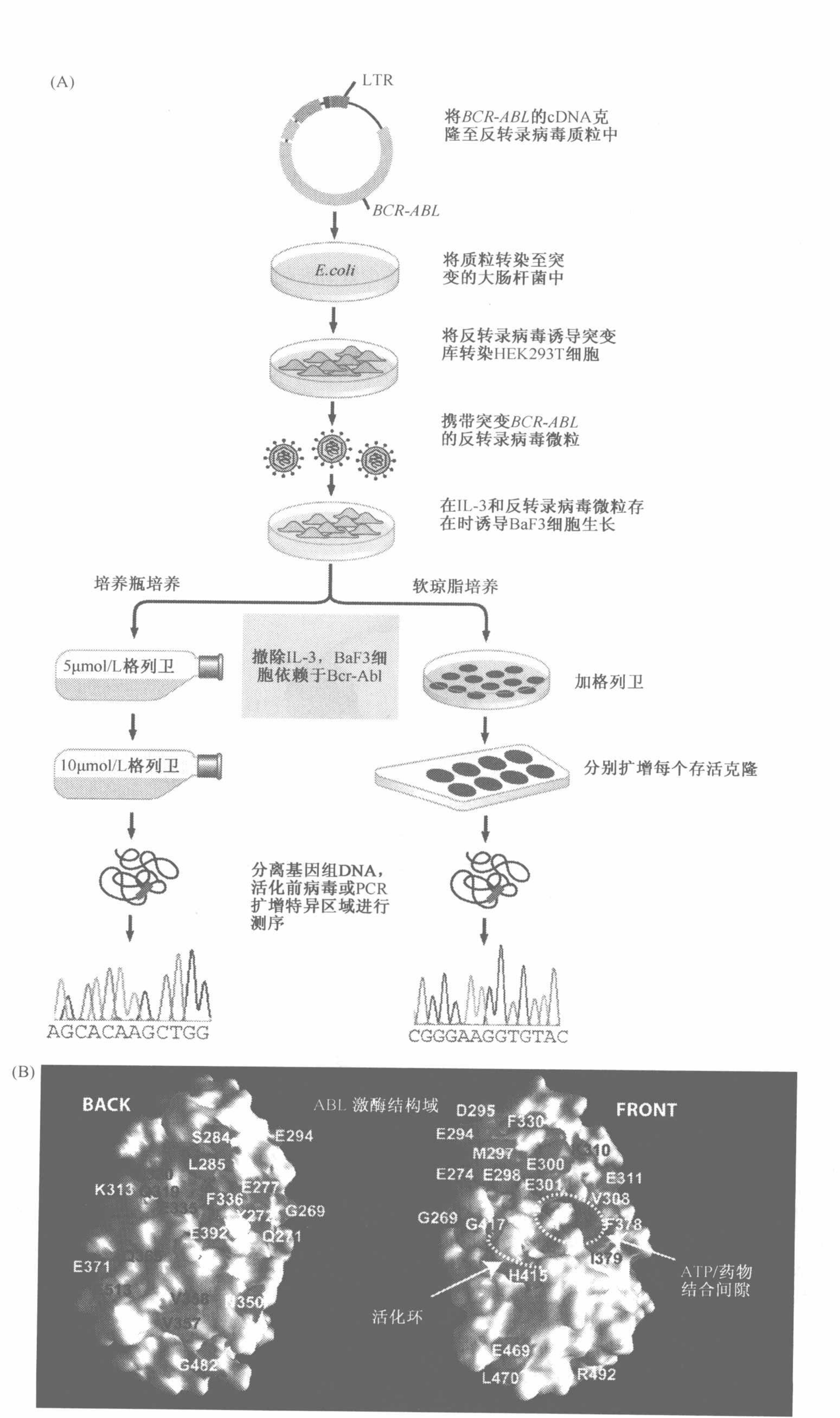

(A)
LTR
BCR-ABL
将BCR-ABL的cDNA克隆至反转录病毒质粒中
E.coli
将质粒转染至突变的大肠杆菌中
将反转录病毒诱导突变库转染HEK293T细胞
携带突变BCR-ABL的反转录病毒微粒
在IL-3和反转录病毒微粒存在时诱导BaF3细胞生长
培养瓶培养
软琼脂培养
5μmol/L格列卫
撤除IL-3，BaF3细胞依赖于Bcr-Abl
加格列卫
10μmol/L格列卫
分别扩增每个存活克隆
分离基因组DNA，活化前病毒或PCR扩增特异区域进行测序
AGCACAAGCTGG
CGGGAAGGTGTAC
(B)
BACK
ABL 激酶结构域
FRONT
S284
E294
L285
K313
E277
F336
G269
E392
Q271
E371
V338
V357
G482
D295
F330
E294
M297
E300
E274
E298
E311
E301
V308
G269
F378
I379
H415
ATP/药物结合间隙
活化环
E469
L470
R492

图 16.25　格列卫耐药的 Bcr-Abl 突变型的体外筛选试验　耐药的 Bcr-Abl 突变型的检测方法涉及细胞培养，如图 16.17 描述的 Bcr-Abl 蛋白依赖性 BaF3 细胞。这种表达 Bcr-Abl 的细胞接受格列卫治疗后，它们对持续性 Bcr-Abl 信号转导的依赖性导致了它们的死亡。（A）表达"野生型"BCR-ABL 蛋白的 cDNA 克隆（如染色体易位的直接产物）能够通过在 DNA 复制过程中具有高度易错倾向（error-prone）的 *E. coli* 细菌的传递而发生突变，从而将突变型引入了携带 *BCR-ABL* 序列的质粒。这些发生了随机突变的表达 Bcr-Abl 的克隆通过反转录病毒载体被引入 BaF3 细胞，随后接受格列卫的治疗。通过悬浮培养或软琼脂形成筛选具有格列卫耐药性的少数细胞克隆，从而确定产生格列卫耐药的突变型 BCR-ABL 的基因序列。（B）通过对格列卫耐药的突变型 BCR-ABL 蛋白的分析发现，很多突变型都是 Bcr-Abl 蛋白的 Abl 激酶区域内单个氨基酸的替代。ABL 激酶区域的"前"、"后"面成像如图所示，图中还包括了正常氨基酸序列和发生突变的各个位点。令人惊奇的是，ABL 区域各个不同位点的突变都能够导致格列卫的耐药，这表明 CML 细胞产生耐药性的途径非常多样化。很多突变位点都集中在 Abl 正对着催化部位的一侧（左图）；部分突变点（红色）参与了 Abl（图中未显示）的激酶（如 SH1）区和 SH2、SH3 区的相互作用。其他不在激酶区的突变位点（蓝色）导致耐药性的机制目前并不清楚。此项关于格列卫耐药的 Bcr-Abl 突变型的体外筛选试验揭示了大部分在患者中发现的突变类型以及一些目前为止并没有记录的突变类型。（From M. Azam，R. R. Latek and G. Q. Daley，Cell 112：831-843，2003.）

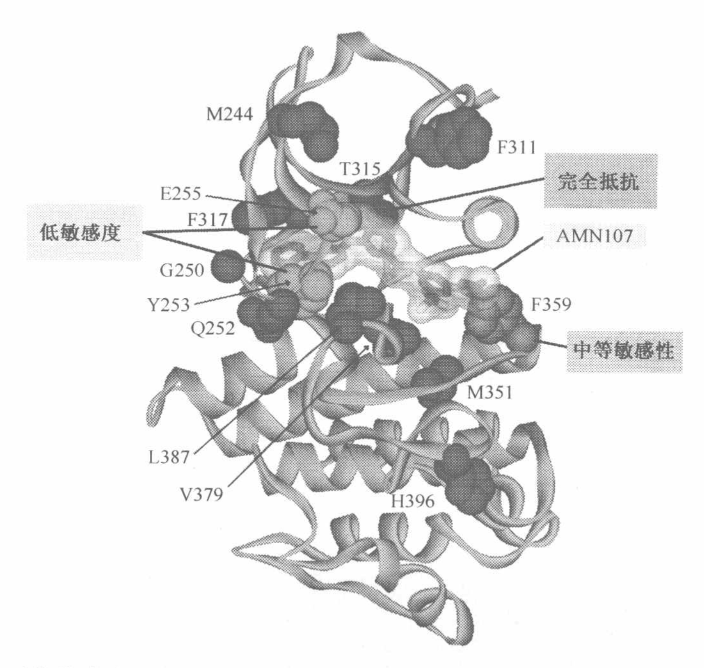
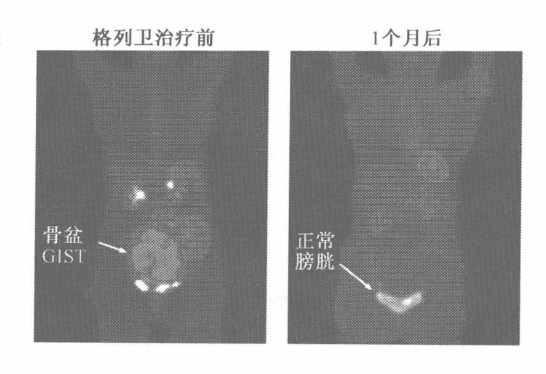


图 16.26　格列卫耐药的肿瘤患者后备的 Bcr-Abl 抑制剂　CML 急性期（急变期）的患者常常会出现格列卫耐药，这一现象促进了其他 Abl 酪氨酸激酶抑制剂的发展。其中一种抑制剂 AMN107 如图所示［黄色的空间填充模型（space-filling model）］，橙色的线条图，图中 Bcr-Abl 的酪氨酸激酶区域还标明了在格列卫耐药患者体内发现的突变型 Bcr-Abl 上发生氨基酸替代的位点（各部位彩色小球的数目代表了发生替代的氨基酸侧链上的原子数目）。在格列卫耐药的突变型 Bcr-Abl 中，如果发生氨基酸替代的区域有红色小球的突变型 Bcr-Abl 对 AMN107 的抑制作用高度敏感，有橙色小球的（如 F359）则具有中度敏感性，有淡绿色小球的（如 Y253）则敏感性较低。还有一种对格列卫耐药的突变型 Bcr-Abl 同样对 AMN107 完全耐药（蓝色小球，剩下的 T315）［"M244"表明在正常形态下的第 244 号位点，原来的氨基酸如缬氨酸（没有体现在符号中）被蛋氨酸所替代］。（From T. O'Hare，D. K. Walters，E. P. Stoffregen et al.，Cancer Res. 65：4500-4505，2005.）

图 16.27 格列卫治疗胃肠间质肿瘤 格列卫对Kit受体的酪氨酸激酶活性具有抑制作用。由于胃肠间质肿瘤（GIST）中突变、部分活化的Kit受体广泛存在，这一现象提示格列卫可能对GIST有效。如图所示，患者的GIST摄取了经过标记的葡萄糖类似物后被显影（左图，盆腔，红色部分），接受格列卫治疗后病灶明显缩小（右图）（治疗后图中的标记部分是标记物在患者膀胱中的聚集）。不幸的是，大部分GIST都在一段时间后出现格列卫耐药，开始治疗后2.5年约有75%的患者接受格列卫治疗时不再有效。(Courtesy of G. D. Demetri.)



格列卫是第一个通过理论设计并成功应用于临床、对多种不同类型的肿瘤都有效的药物。最初，格列卫影响多个酪氨酸激酶的特性被认为是格列卫的一大缺点，因为这种广谱的活性会导致不可接受的副作用。但是，随着时间的推移，这种多靶点作用在某些肿瘤治疗中的应用逐渐为人所知。许多肿瘤的存活和增殖取决于多个酪氨酸激酶的协同作用，而同时作用于多个酪氨酸激酶的能力将会在肿瘤治疗中取得巨大的优势。

不幸的是，肿瘤干细胞的存在限制了格列卫的应用。对包括造血细胞肿瘤、乳腺癌和脑肿瘤的研究已经发现肿瘤干细胞只占肿瘤中细胞成分的很小一部分（≪5%），并且只能通过检测它们的肿瘤形成能力或通过荧光活细胞分选术来识别它们（FACS：见11.6节）。格列卫已经表现出对细胞周期活跃的白血病细胞具有很强的杀伤能力（即“转化增殖”或“前体”细胞）。然而，肿瘤干细胞群体中的许多细胞在某单一时间点处于活跃的细胞周期之外，因而它们对药物治疗具有相当的抵抗性。结果是一旦治疗停止，这些肿瘤干细胞就会重新进入生长与分裂的循环，产生转化增殖的前体细胞，导致肿瘤再生长和临床复发（图16.28）。这一现象解释了为什么格列卫治疗需要长期维持和为什么未来的药物开发需要通过杀死肿瘤干细胞来攻击肿瘤的核心（见信息栏16.2）。

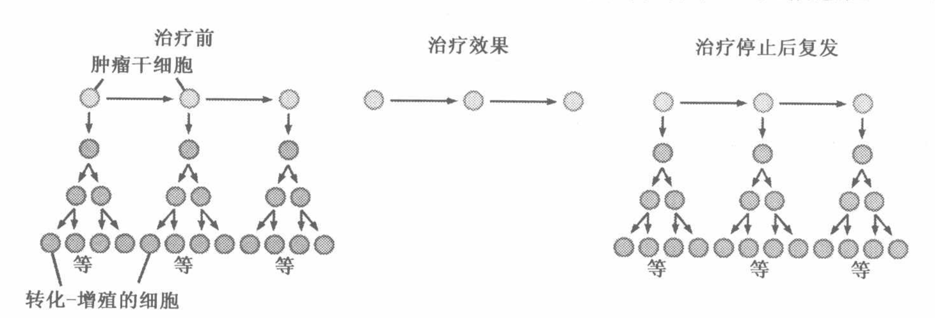


图 16.28 肿瘤干细胞在抗肿瘤治疗中的作用 一些零散的资料表明在多数肿瘤中都有一小部分具有自我更新能力的肿瘤干细胞（灰色）。它们分散在构成肿瘤主体的细胞（粉色）之间，与正常的原始细胞或短暂扩充细胞具有很多相同的特性。以格列卫为例，如果抗肿瘤治疗只是消灭了那些短暂扩充细胞，而没有消灭肿瘤干细胞，那么在治疗停止之后后者会导致肿瘤很快复发。

信息栏 16.2　肿瘤干细胞使抗肿瘤治疗的评价复杂化　许多实体肿瘤中存在的肿瘤干细胞严重地影响了对多种抗肿瘤治疗的评价。例如，如果一个候选药物能清除肿瘤中的干细胞而不影响肿瘤中的其他绝大部分细胞，那么在治疗后的肿瘤体积首先不会有明显改变。只有当这些转化-增殖细胞经过几周甚至是几个月的时间逐渐衰老死亡之后，肿瘤才会出现缓慢的体积缩小。尽管这样的药物可能会成功杀死肿瘤细胞，但它可能会因为最初的治疗反应很弱而被判断为不存在进一步开发价值。

实际上，利妥昔单抗（rituximab）这一抗 CD20 单克隆抗体用于治疗 B 细胞瘤（见 15.20 节）正好体现了这一行为：它能清除多发性骨髓瘤中的肿瘤干细胞，而不是已经分化、大量存在的具有抗体分泌功能的肿瘤细胞（幸运的是，在利妥昔单抗开发的早期就已经认识到它对治疗多种 B 淋巴细胞系肿瘤具有较好的疗效，因此被批准进行开发并推荐进入临床）。

相反，仅能杀死瞬时增殖细胞的候选药物只是带来了成功的错觉：治疗后肿瘤会明显回缩，但治疗停止后它会很快反弹（见图 16.28）。有时将这种现像称为“蒲公英效应”，就是说像草地上的草被割掉后又快速出现一样，因为只割去了它们的叶子而没有除掉它们的根。

然而，如果一个药物能像格列卫一样成功达到临床缓解并能维持多年的时间，那么它虽然不能杀死 CML 中的干细胞，这种不足也是可以接受的。格列卫是抗肿瘤药物开发中一个很成功的例子，因为它对于治疗这一无情进展的疾病来说明显优于其他所有的治疗方法。

16.12　EGF 受体拮抗剂可能用来治疗多种类型的肿瘤

格列卫的开发最初在它发源的药物公司遇到了相当大的阻力，原因只是这一药物的预期市场非常小以至于不能填平药物开发和临床试验的巨额费用。但对另一类抑制表皮生长因子受体（EGF-R）的药物来说则是不一样的。癌是最常见的肿瘤，现在认为这一受体在 1/3 的肿瘤中通过高表达发挥着关键性的作用。

目前至少已经发现了包括 EGF 本身在内的 6 种不同的 EGF 相关配体能够结合并激活 EGF-R。这意味着即使在 EGF-R 并没有高表达的癌症中，它也可能通过一种或多种配体驱动自分泌和旁分泌信号环路的活跃来触发关键的癌信号。而且，在高表达 HER2/Neu 受体的乳腺癌中，这一蛋白的促癌作用可能依赖于它与 EGF-R 这一同族蛋白形成异源二聚体的能力。在这一异源二聚体中，EGF-R 能磷酸化 HER2/Neu 并由此激活癌症发生的信号通路。

研究最充分的两个 EGF-R 酪氨酸激酶抑制剂是易瑞莎和特洛凯，它们也分别被称为吉非替尼/ZD1839 和埃罗替尼/OSI-774（图 16.29A）。这两个药物具有十分相似但不完全相同的特性，这在这一章前面的部分中已经提到了。这两个药物都是通过阻断这一受体相关激酶的 ATP 结合位点来发挥作用的（图 16.29B；也见于图 16.14）。

一旦通过抑制 EGF-R 剥夺了肿瘤细胞的受体信号转导，它们就失去了由这一受体驱动的强烈的促有丝分裂和抗凋亡作用。例如，在许多上皮细胞类型中，持续的 EGF-R 信号能维持 $Bcl-X_L$（与 Bcl-2 同一家族的具有强烈抗凋亡作用的蛋白）的表达，活化 MAPK 磷酸化的启动和前凋亡蛋白 Bad 的功能失活。

由于易瑞莎和特洛凯都是作用于细胞表面受体，它们的治疗作用能与同样作用于

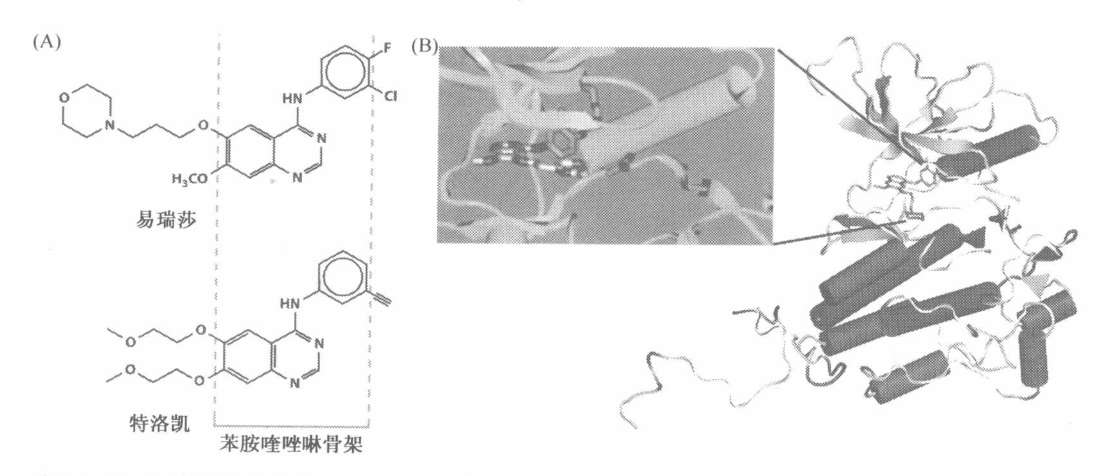


图 16.29 易瑞莎和特洛凯 (A) 这两个表皮生长因子受体(EGF-R)拮抗剂具有相同的苯胺喹唑啉骨架,这使它们具有对受体酪氨酸激酶ATP结合位点的亲和性。但联结于骨架的化学侧链具有生物学效应,这就使这两个药物具有不同的肿瘤疗效[如对非小细胞肺癌的治疗(NSCLC)]。(B) 易瑞莎也称为ZD1839,它结合的EGF-R酪氨酸激酶区域与特洛凯(见图16.14)非常相似。EGF-R酪氨酸激酶的药物(右)结合位点的放大示意图如图所示(左),图中彩色的棒状图表示药物分子。药物与位点的结合能力非常强,在大约0.03pmol/L的浓度下即可抑制酪氨酸激酶活性的50%。(B, courtesy of A. C. Kay, AstraZeneca.)

该受体的单克隆抗体相比较(信息栏15.4)。原则上,这些小分子质量化合物能穿透实体肿瘤的所有间质,包括那些大分子质量的抗体分子很难进入的地方也能进入(表16.3)。而且,与生产大量的单克隆抗体相比,低分子量化合物更容易达到化学生产的规模。

低分子质量酪氨酸激酶抑制剂还有其他的可能优势。例如,我们已经知道在许多人类癌症中存在缺少胞外功能区的截短的EGF-R。这些突变的EGF-R能以配体非依赖的方式持续发出生长信号,即具有强烈的癌蛋白的功能(图5.11)。与此相似,约有一半的进展期胶质瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤,GBM)表现为EGF-R高表达。在这些肿瘤中,又有大约40%的肿瘤表达的EGF-R受体缺少由编码序列中外显子2-7编码胞外区。这些截短的受体不能被单克隆抗体(MoAb)识别,因为这些抗体只能识别正常受体蛋白的胞外区抗原表位。但这却不能阻止低分子质量的酪氨酸激酶拮抗剂发挥作用,因为这些药物作用于这一受体胞内区的信号触发区。

这些药物的不足之处是这些药物的药物代谢动力学特性:与易瑞莎类似的药物在循环中的半衰期经常介于几小时到几天之间,而治疗用单克隆抗体能在循环中存在数周。由于所有的此类药物都具有这种特点,就需要密切监测循环中易瑞莎的稳定状态的浓度以保证体内肿瘤细胞获得足够的药物剂量(图16.30)。如果每日用药,可以维持药物的有效浓度,其半衰期达到40h甚至更长的时间。

易瑞莎对EGF-R相关酪氨酸激酶活性的抑制能力比对其他许多已经检测过的酪氨酸激酶活性的抑制能力强50倍以上(如图16.15B所示),因此它在肿瘤临床的最初应用也是令人鼓舞的。在第一步的临床试验中,10%的非小细胞肺癌(NSCLC)患者显示了包括稳定肿瘤生长在内的对药物的部分反应性。这些患者大部分是不吸烟

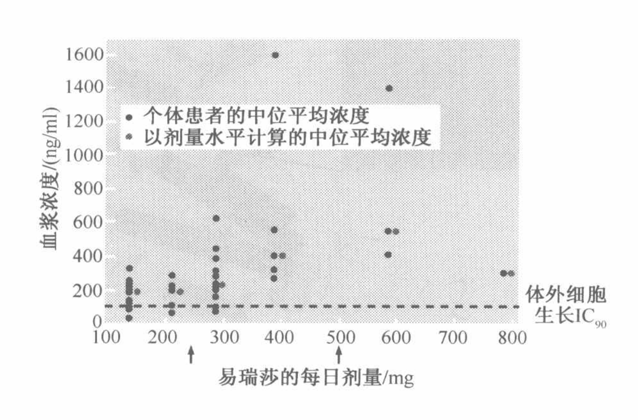


图 16.30 易瑞莎的药物代谢动力学 在易瑞莎的I期临床试验中，每日用药后7天血浆中的药物浓度达到稳定状态。每日用药剂量不同的患者间的达到稳定状态浓度是很不相同的（红色圈）。这一组患者中的中位平均浓度用蓝圈表示。使 KB 人上皮样癌细胞体外生长抑制达到 90%（即 IC 90%）时所需的易瑞莎浓度如虚线所示（约 100ng/ml）。因此，即使最小剂量的临床用药就能产生较高的血浆药物平均浓度。最终选择了 250mg/d 和 500mg/d 剂量（箭头所示）进行随后临床 II 期试验。（From R. S. Herbst, A. M. Maddox, M. L. Rothenberg et al., J. Clin. Oncol. 20：3815-3825，2002.）

的女性和支气管肺泡型的肺癌。在日本进行的一项平行研究中发现患者对易瑞莎的部分反应率更高（27%）。对药物反应的差异可能代表着日本人与高加索人的遗传组成方面的差异（NSCLC 类型的肿瘤是一类很难治疗的肿瘤，最初诊断后 5 年的生存率只有 15%）。

这些结果是令人满意的，因为它们在患者中产生了明确的治疗反应，而如果患者接受其他任何治疗方法都不会产生治疗反应。但是，与单独应用化疗药物治疗占美国肺癌 80%的 NSCLC 相比，易瑞莎与标准化疗药物合用产生的协同效应并没有使患者的生存获益。当单独应用时，特洛凯能提高对标准化疗药物治疗耐药的 NSCLC 患者的总体生存时间，而易瑞莎没有这种作用。

从这些初期试验中得到了一些有价值的经验，可以在随后这些药物和相似药物的临床试验中提高患者的反应性。第一，治疗过程中 EGF-R 对肿瘤生长的特异贡献尚没有报道，因此较高的治疗反应率可能来源于对 NSCLC 患者的分层选择和只将易瑞莎用于具有特异性分子标志的肿瘤。第二，其他突变蛋白在促有丝分裂作用和抗凋亡方面的作用还没有得到评价。例如，有证据表明 PTEN 阴性的肿瘤（PI3 激酶通路反应性增高；见 6.6 节）对易瑞莎没有反应性，并且 Akt/PKB（PTEN 灭活后活性增强的下游分子）抑制剂能与易瑞莎协同作用阻断肿瘤生长。第三，只进行了较少的临床前研究来优化药物的剂量和治疗方案。

2004 年，在第一次报道了易瑞莎的初期临床试验结果之后 4 年，波士顿的两个研究小组分别独立地从分子角度解释了观察到的对易瑞莎的不同反应性。从前只是从 NSCLC 细胞中 EGF 受体是否高表达或是否以截短形式存在两方面研究了 EGF 受体的状态。这也确实是人胶质母细胞瘤中存在的情况。但 2004 年进行的研究中，研究者们对接受易瑞莎治疗的 NSCLC 患者中 EGF-R 编码基因的读码框进行了测序。

结果他们惊奇地发现几乎所有对易瑞莎治疗具有较好反应性的患者（占总患者的 10%）的肿瘤细胞都携带结构发生了改变的 EGF-R。在对易瑞莎治疗没有反应的肿瘤中没有发现这一突变型的受体，即使在表达高水平的 EGF-R 的肿瘤患者也没有发现这

一突变（见补充材料 51 ◎）。这一突变在激酶结构域产生了氨基酸替换和小片段的缺失，而不是在胶质母细胞瘤中发现的典型的受体胞外区大部分缺失（图 16.31）。类似地，在 7 例对特洛凯治疗反应较好的 5 例患者中也表达了这一突变受体。以目前尚不知道的方式，这一突变受体以不同的模式磷酸化它们 C 端尾部的酪氨酸（6.3 节）并选择性地激活下游的 Akt/PKB 和 STAT5 通路，而 MAPK 信号通路则不受影响。

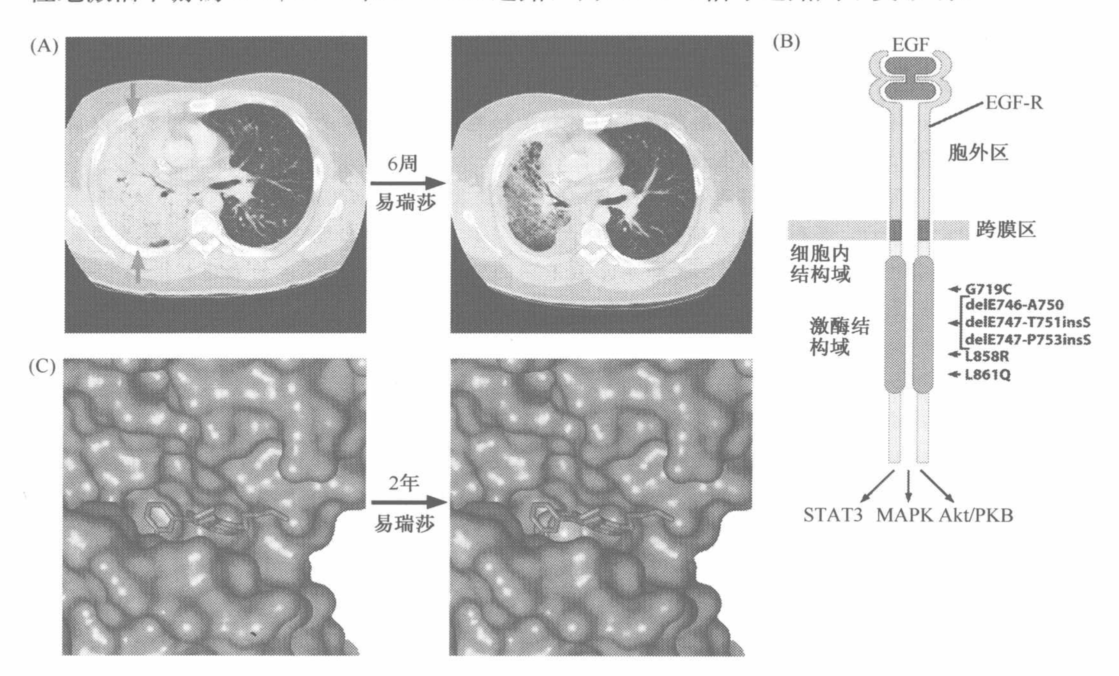


图 16.31 非小细胞肺癌对易瑞莎治疗的反应 (A) 少数耐药非小细胞肺癌（NSCLC）的患者对标准化疗无反应或不再有反应，但对易瑞莎的治疗却有明显的反应。这些计算机体层 X 射线影像显示患者右（左）肺的大片肿物经过易瑞莎 6 周治疗明显缩小。(B) 发现大多数对易瑞莎治疗有反应的非小细胞肺癌携带编码突变的表皮生长因子受体（EGF-R）的基因。这种突变包含缺失（“del”）和点突变，将影响受体的胞浆区。这种 EGF-R 结构的改变使受体酪氨酸激酶功能失调，结果激活下游保护肿瘤细胞免于凋亡的 Akt/PKB 和 STAT 信号通路。(C) 最终，存在一些特定突变的患者经易瑞莎或特洛凯治疗后会复发。格列卫治疗后产生获得性耐药，这些非小细胞肺癌患者的 EGF-R 经常获得结构的改变并封闭药物的结合。这里有一例患者，他的肿瘤相关 EGF-R 表现为 delE747-P753insS 突变类型（B），经易瑞莎治疗后缓解；但是两年后肿瘤复发。对复发的肿瘤 *EGF-R* 基因测序发现，由于苏氨酸被蛋氨酸取代（右）使野生型受体（左）的结合位点被部分封闭，导致大量蛋氨酸侧链（橙球）阻止易瑞莎的结合。(A and B, from T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella et al., N. Engl. J. Med. 350: 2129-2139, 2004; C, from S. Kobayashi, T. J. Boggon, T. Dayaram et al., N. Engl. J. Med. 352: 786-792, 2005.)

这些发现提供了确凿的证据表明 EGF-R 在这一小部分肿瘤的生长中发挥了核心作用。另外，它们也表明了在用如易瑞莎和特洛凯之类的分子靶点药物治疗肿瘤时利用分子标志物对肿瘤进行分层（次级分类）的重要性。但是，这些实验并没有揭示为什么易瑞莎和特洛凯对这些特殊的肿瘤具有如此强烈的作用（见信息栏 16.3）。

信息栏 16.3　原癌基因成瘾也许能解释易瑞莎和特洛凯是如何成功杀死非小细胞肺癌的　在一些非小细胞肺癌中发现突变的 EGF-R 能使这些特殊的肿瘤细胞比表达野生型受体的肿瘤细胞对易瑞莎敏感高约 100 倍，这使患者的实际血药浓度降到这种选择性抑制作用的允许范围。

"原癌基因成瘾"的机制可被解释为 EGF-R 抑制剂对表达突变 EGF-R 肿瘤细胞的选择性作用。原癌基因成瘾是指一些肿瘤细胞的生长和存活特异地依赖于一种原癌基因或原癌蛋白，然而其他的肿瘤可以丢失这个基因或蛋白并不遭受明显的后果。

要解释这种现象，我们设想一些原癌基因在野生细胞中表达通常是有害的，但确实对以前获得了特定突变等位基因的细胞的生长来说是有益的。

myc 原癌基因就是一个很好的例子。除非细胞被以前获得的其他抗凋亡等位基因（如 *ras* 原癌基因）保护免于凋亡，否则 myc 会促使细胞凋亡。如果抗凋亡基因出现突变，*myc* 原癌基因就表现出明显的促有丝分裂作用。携带 *ras* 和 *myc* 癌基因的肿瘤细胞就像对 *ras* 的表达"成瘾"一样，因为一旦 *ras* 原癌基因被剥夺它们就会通过凋亡迅速死亡。

相应的，肿瘤进展的早期，获得特定的癌基因，如突变的 *EGF-R* 基因，产生的细胞环境能使其他正常情况下对细胞非常有害的癌基因活化。如果现在丢失 EGF-R 突变的受体，其他癌基因的有害作用，特别是那些有利于凋亡的作用就会变得显著，最终导致细胞活力的快速丧失。

对非小细胞肺癌来说，存在突变受体的肿瘤细胞能依赖于突变 EGF-R 的作用而生存和增殖，即它们对突变的受体"成瘾"。相反，越来越多的表达野生型 EGF-R 的非小细胞肺癌产生了保护有丝分裂和生存信号的其他方法，如在一些肺癌中发现的受体非依赖性的 MAPK 和 PI3K 信号通路。

用 siRNA 抑制野生型或突变型受体表达的实验进一步证明了这个理论：存在突变 EGF-R 的非小细胞肺癌迅速死亡，而显示野生型受体的细胞只受到轻微的影响（图 16.32B 和 C）。结果，存在突变 EGF-R 肿瘤细胞的死亡并不是由于易瑞莎或特洛凯产生的一些未知的靶外效应引起的，而是直接由于失去这些受体释放的有益信号产生的。此外，这些实验表明如果 EGF-R 抑制剂和抑制另一种功能如信号通路的药物 PI3K 联合应用，可能对表达野生型受体的非小细胞肺癌产生更明显的治疗作用。

而且，实际上所有的这些成功都是很短暂的，大部分患者在治疗 6～18 个月后出现了复发，对药物治疗产生了抵抗性。这又一次突出表明需要发展替代药物治疗具有抗药性受体的肿瘤；也需要进行多药治疗以同时应用多种具有协同作用的药物。的确，一些与苯胺喹唑啉骨架具有不同结构的药物分子能关闭对易瑞莎或特洛凯具有抵抗性的 EGF-R 的功能，这为经这两种药物延长治疗后复发的患者带来了希望。

16.13　蛋白酶体抑制剂产生的意想不到的治疗作用

偶然运气在世界药物开发中发挥了显著的作用。某些情况下，抗肿瘤药物的发展只是理性药物设计过程的一部分。尽管和最初因灵感启发而产生的研制动机毫不相关，但最终却产生了经验证非常有效的药物。万珂，Velcade 是药物发展最好的例证，它也称为 PS-341 和硼替佐米（bortezomib）（图 16.32A）。

我们在这部书的许多地方讲述了关键细胞调节蛋白的水平是如何由它们的合成和降解平衡来调控的。许多的降解过程又是由泛素蛋白酶体系统调控（信息栏 7.8）。当蛋白被多泛素标记，它就会被运输到蛋白酶体上，并在这个胞内装置中发生降解。

肿瘤相关的恶病质最先引起了研究者们对蛋白酶体抑制剂的兴趣。恶病质在肿瘤进展的晚期发生，是一个肿瘤患者组织被渐进性消耗的过程，目前机制不明。蛋白酶体抑制剂有望能够有效延缓恶病质患者中广泛的组织降解。已经至少尝试过 5 种不同种类的蛋白酶体抑制剂，但是大部分由于它们的代谢不稳定、缺少特异性和不可逆结合并灭活蛋白酶体等原因而被放弃了。万珂，Velcade 是其中一种包含硼酸二肽的蛋白酶体抑制剂，被设计成蛋白酶体 20S 核心的肽酶（肽剪切）活性特异性抑制剂（图 16.32B）。它有非常高的效能，仅在 0.6nmol/L 的浓度下就能够抑制 50%蛋白酶体的胰凝乳蛋白作用活性。作为酶活性竞争抑制剂，Velcade 减慢蛋白酶对底物的结合，使其功能受阻。

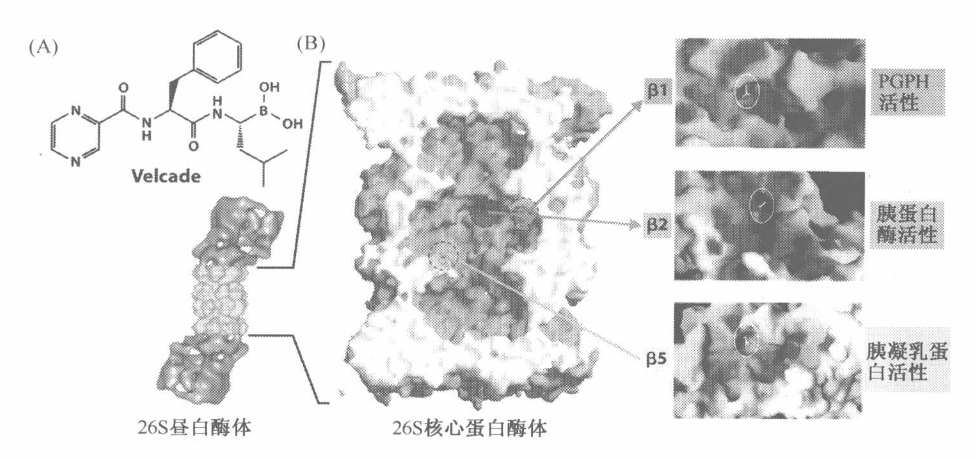


图 16.32 Velcade 和其对蛋白酶体的作用 （A）Velcade 的化学结构展示了药物中不常见的硼原子的存在。已知像 Velcade 这样的肽硼酸能通过模仿糜蛋白类丝氨酸蛋白酶（在苯丙氨酸和酪氨酸残基附近切割底物蛋白）的正常底物来结合其活性位点。表明这种化合物能抑制蛋白酶体 20S 核心的糜蛋白酶样活性位点。（B）酵母蛋白酶体 20S 核心横切面图（左，也可见图 7.27）显示了这三种不同催化位点，包括 β1、β2、β5 亚基，它们分别负责肽酰谷氨酰肽水解活性（PGPH；粉色）、胰蛋白酶活性（亮蓝）和糜蛋白酶水解活性（亮黄）。Velcade 表现出优先强烈抑制 β5 糜蛋白酶的活性（详细结构见右下），对 β2 胰蛋白酶活性相互作用较弱（右中），对 β1PGPH 活性无作用（右上）。每一个催化部位上的关键亲核苏氨酸残基用棒状图表示（内部为白色的白色椭圆形）；催化裂隙的碱性氨基酸（右）呈蓝色，酸性氨基酸呈红色，疏水残基呈白色。（B，from M. Groll，M. Bochtler，H. Brandstetter et al.，Chembiochem 6：222-256，2005.）

蛋白酶体介导的蛋白降解在许多重要的细胞信号通路中起关键的调节作用，这也拓宽了 Velcade 开发者的视野。因为其他的蛋白酶体抑制剂能杀死多种培养的肿瘤细胞。而 Velcade 在临床 I 期试验中被用于现有治疗手段失败的肿瘤患者。它对实体肿瘤患者很少有反应，但是对一组血液肿瘤患者，如 B 细胞来源的恶性肿瘤——多发性骨髓瘤（产生抗体的浆细胞占据骨髓大部分，见图 2.19A，患者骨髓细胞产生溶骨损伤导致骨折，并挤满残存的骨髓腔，结果产生严重的免疫抑制，引发重度感染而死亡）在治疗之初就产生明显的治疗反应，能使肿瘤消退（见图 16.33A）。这使其他的骨髓瘤患者也迅速加入这个 I 期实验，最终产生了 Velcade 治疗骨髓瘤的大规模临床试验。

在后来的一组快速进行性多发性骨髓瘤患者 I 期临床试验中，Velcade 显示出明显的“目标反应”，它使 55%的患者疾病进展减慢，另外有 25%的患者疾病进展停止。II 期临床试验中，半数患者接受 Velcade 治疗，另一半给标准的地塞米松治疗方案作为对照。这些患者中大多数是经常规骨髓瘤化疗药物治疗失败者。这个实验在 2003 年提前完成，因为要么少数患者显示完全有效（complete response，CR；骨髓瘤细胞在血液中消失至少 6 周以上），要么 35%的接受 Velcade 治疗患者表现部分有效（partial response，PR，血液中骨髓瘤细胞分泌的抗体至少降低 50%，同期尿中这种抗体降低 90%），（显示了明显优于现有的治疗方法的。结果对照组的患者也被允许采用相同的治疗。后来的临床试验中发现，Velcade 治疗组的患者平均 7 个月后疾病进展至下一阶段，而对照组平均 3 个月后就会进展至相同程度。此外，临床前研究表明，相对小剂量 Velcade 能增加骨髓瘤细胞对化疗药物的敏感性，使化疗药物更有效（见图 16.33B）。

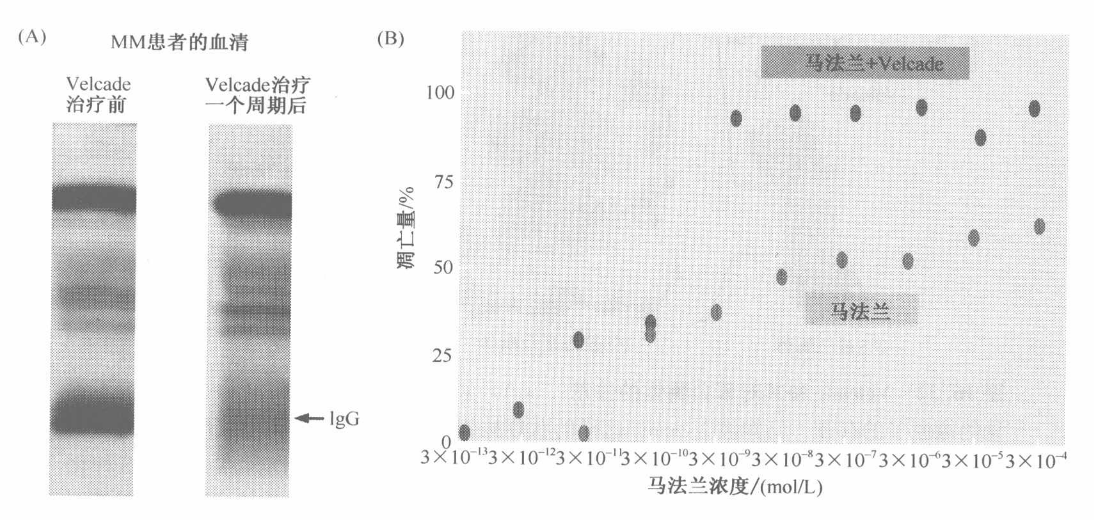


图 16.33 多发性骨髓瘤和 Velcade 的生物效应 （A）Velcade 对骨髓细胞组分和血液中抗体分子组分有重要作用。一个多发性骨髓瘤患者，一个周期 8 次服用 Velcade 后，骨髓中恶性浆细胞从总体细胞数的 41%降至 1%。同时，这种骨髓细胞所产生的单种 IgG 也明显减少。如图，凝胶电泳上方，治疗前少量存在的 IgG（预示肿瘤单克隆，左）在治疗后突然向健康个体的 IgG 多克隆式样的非均质移行（右，见图 2.19A）。（B）马法兰，一种治疗多发性骨髓瘤的常规烷化化疗药物，在体外以不同剂量单独加入（绿色）或与非细胞毒剂量的 Velcade 一同加入（红色）到多发性骨髓瘤细胞系中。Velcade 存在的情况下，马法兰在 3nmol/L 时能够诱导广泛的细胞凋亡，而单独使用时在该剂量或更高剂量都未能诱导凋亡。（A，from R. Z. Orlowski，T. E. Stinchcombe，B. S. Mitchell et al.，J. Clin. Oncol. 20：4420-4427，2002；B，from M. H. Ma，H. H. Yang，K. Parker et al.，Clin. Cancer Res. 9：1136-1144，2003.）

事实上，让骨髓瘤患者进行最初的临床试验是很偶然的。认为可以应用蛋白酶体抑制剂靶向治疗多发性骨髓瘤是因为发现骨髓瘤中 NF-κB 信号通路持续活化，而 NF-κB 在细胞增殖中起重要作用。在 6.12 节，我们提到 NF-κB 通常被其抑制因子 IκB 隔离在胞浆。当 IκB 被 IκB 激酶 IKK 这一特异激酶磷酸化时，IκB 多泛素化并降解；释放出 NF-κB 进入细胞核，活化多种抗凋亡基因和促生长基因的表达（见图 16.34 和 16.35；

也可见图 6.29A 和 11.37B)。

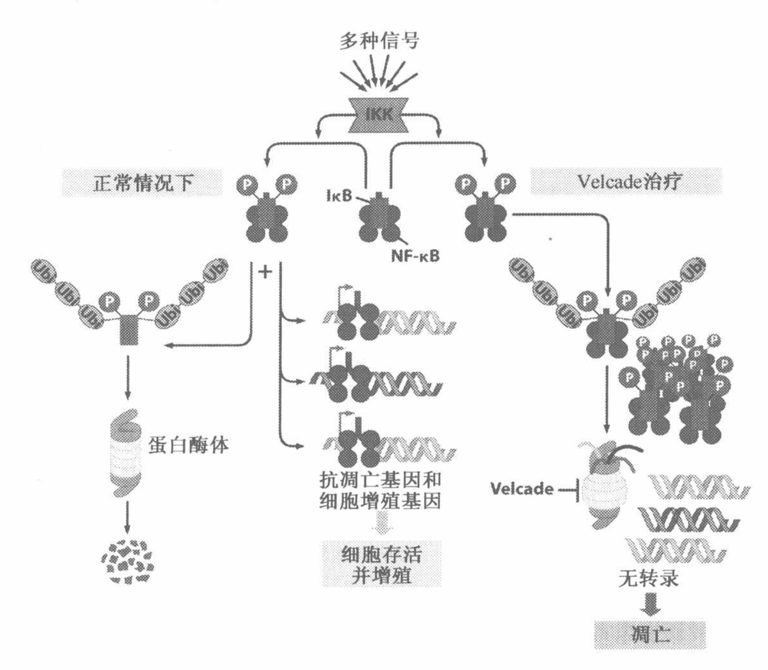


图 16.34 Velcade 的作用机制 Velcade 通过抑制信号通路中转录因子 NF-κB 的活性导致骨髓中多发性骨髓瘤细胞凋亡。正常细胞中(左)多种应激如促有丝分裂和营养信号能够激活 IκB 激酶(IKK,紫色)信号通路。骨髓瘤细胞以及其他肿瘤类型中也有相似的信号调控,多种机制可以使 IKK 持续活化。一旦被激活,IKK 磷酸化 NF-κB 的抑制因子 IκB(红)。这一磷酸化导致 IκB 泛素化(左),被蛋白酶体降解(左下)。缺少了 IκB(中)的抑制作用,NF-κB(蓝)可自由进入核内,活化多种增殖和抗凋亡基因的表达。Velcade 存在时(右),IκB 的磷酸化和泛素化过程正常,但是因为蛋白酶体被不能被降解的多肽所占据,泛素化的 IκB 不能被蛋白酶体降解。这导致胞浆中 IκB 富集和持续螯合 NF-κB(右)。结果,NF-κB 不能入核并活化主要的抗凋亡基因。这就在骨髓瘤细胞中向促凋亡的调节平衡倾斜,导致细胞的死亡。另外 Velcade 还能促进 p53 分子蓄积,这有可能也在治疗中促进了骨髓瘤细胞凋亡(未显示)。

和其他多泛素化蛋白一样,泛素化的 IκB 在蛋白酶体中被降解。因此,如果蛋白酶体的活性被抑制了,IκB 就不能被降解,而是在胞浆中螯合 NF-κB,抑制其入核发挥转录因子活性。在核内,活性 NF-κB 是已知的诱导 IL-4 和 IL-6 表达的重要转录因子,这两种白细胞介素作为重要的自分泌因子调节骨髓瘤细胞的生长和存活。另外,正如后面提到的,NF-κB 在多种肿瘤细胞中起重要的抗凋亡作用;NF-κB 活性的丢失能使这些细胞的信号转导平衡向促凋亡倾斜。更特异的是,一旦肿瘤细胞丢失了 Bcl-2、cIAP-2 和 XIAP 这些抗凋亡蛋白(所有这些蛋白受 NF-κB 活性调节),这些细胞就会滑向凋亡的深渊。

但是,所有这些都不能解释为什么 Velcade 能通过 NF-κB 信号通路促进骨髓瘤细胞凋亡而不能作用于其他的细胞。从骨骼瘤细胞的生长和存活高度依赖于它们合成的 VEGF(血管内皮生长因子见 13.1 节)和黏附分子这一现象可以得到一些线索。黏附

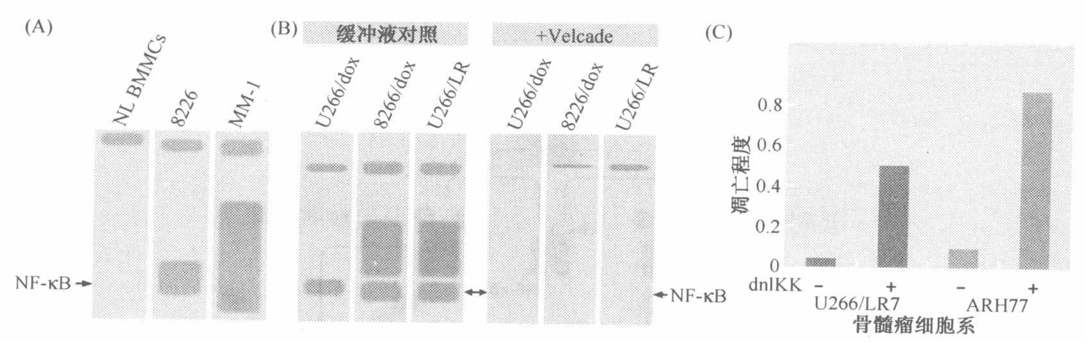


图 16.35　Velcade 诱导凋亡依赖于重要的 NF-κB 信号通路的支持证据　很多证据支持了图 16.34 所展示的内容（A）电泳迁移实验（EMSA，也叫凝胶阻滞实验）中，可以将核蛋白抽提物与放射性标记的携带 TE 结合位点的 dsDNA 寡核苷酸混合来评估 DNA 结合转录因子的存在及其浓度。与 TF 结合成核酸蛋白复合体的寡核苷酸的量反映了 DNA 结合转录因子的存在。与寡核苷酸相作用的大分子蛋白使寡核苷酸的电泳速度减慢，因而会在电泳胶中的特定位置出现。图中箭头指示的是包含转录因子和放射性标记的寡核苷酸的复合物的预期位置。本例中的寡核苷酸来源于 NF-κB 下游激活的 TNF-α 基因的启动子区。这一分析并不能提示正常骨髓单核细胞（NL BMMC）中是否存在可检测到的 NF-κB 活性、多发性骨髓瘤细胞系（8226）中是否存在相当的 NF-κB 活性，以及直接从多发性骨髓瘤患者（MM-1）中制备的骨髓细胞中存在大量的 NF-κB 活性。（B）同栏 A 一样，应用 EMSA 实验显示了分别应用对照缓冲液（左三栏）和 Velcade（右三栏）处理的三种 MM 细胞系中功能性 NF-κB 转录因子的水平在三种多发性骨髓瘤细胞中分别不同处理因素的功能性 NF-κB 转录因子水平。Velcade 能基本清除所有细胞中的 NF-κB 的活性。（C）在这个实验中显示了 NF-κB 信号通路对多发性骨髓瘤细胞存活的重要影响，实验将一个表达显性负功能的 IKK（dnlKK）载体加入到两种不同的骨髓瘤细胞中。如果 NF-κB 信号通路对 Velcade 起主要作用，那么 dnlKK 能模仿 Velcade 作用诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡（见图 16.34）。这正是此图所展示的结果。实验中应用不表达 dnlKK 的载体作为对照。（From M. H. Ma，H. H. Yang，K. Parker et al.，Clin. Cancer Res. 9：1136-1144，2003.）

分子能使骨髓瘤细胞黏附到骨髓干细胞（BMSC），使其完成关键的异型相互作用。所有编码这些蛋白的基因都受 NF-κB 活性的调节。

另外，形成骨髓瘤的恶性浆细胞合成并分泌大量抗体分子蛋白。其中一部分蛋白会因为错误的折叠或其他原因在其组装过程中被蛋白酶体降解。而另外一部分则会聚集在骨髓瘤细胞中。因此，浆细胞会快速被缺陷蛋白分子充满，并且对蛋白降解的抑制剂特别敏感。

蛋白酶体功能受到抑制的后果可以用 Velcade 抑制骨髓瘤细胞的例子很好地解释，但是并不是所有的作用都依赖于对 NF-κB 信号通路的干扰。另一方面看，即使合理地应用 Velcade 抑制蛋白酶体功能对治疗策略并没有意义：细胞利用蛋白酶体降解细胞内可能多达几千种不同的蛋白种类，蛋白酶体功能抑制会对身体所有细胞产生强大的毒性作用。因此，抑制蛋白酶体功能的药物不太可能有显著的治疗指数，因为它们杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞同样产生毒性作用。

尽管理论上是这样，但低浓度的 Velcade 在体外表现出杀死肿瘤细胞的强大能力，而对多种正常组织只有很小或可以耐受的毒性。这种药物在几十到几百纳摩尔浓度范围

内能杀死多种培养的肿瘤细胞。它在 1nmol/L 浓度就能杀死多发性骨髓瘤细胞，这不得不让人感到惊奇。

NF-κB 抑制剂能够应用于多种其他肿瘤的治疗。在 11.16 节曾提到，NF-κB 对多种肿瘤的发展起重要作用，并且肿瘤一旦形成 NF-κB 是其维持其肿瘤特性所必需的。另外，基因表达阵列显示显微镜下呈单一均质肿瘤的弥散性大 B 细胞淋巴瘤（DLB-CLs）能够被分成三种不同的亚型（见图 16.5）。活化 B 细胞和纵隔淋巴瘤亚型的肿瘤细胞表现为 IKK 的持续激活。结果，这两种 DLBCL 亚型和其他存在高度 NF-κB 活性的肿瘤一样，被药物公司列为 Velcade 或 IKK 抑制剂治疗的适用。

16.14 一个也许能成为有效抗肿瘤药物的羊致畸因子

抗肿瘤药物的一个重要来源就是自然界中存在的化合物。细菌或真菌产生数不胜数的不同自然产物。例如，1994 编译列出了 11 900 种被分离的不同抗生素，包括一些还能抗哺乳动物细胞的抗生素。另外的 3000 种化合物有其他的生物活性。这些数字仅仅只是皮毛：2001 年对链霉菌属产生的不同生物活性化合物的估计就达到几十万。其中的一部分还对包括肿瘤细胞在内的哺乳动物细胞有细胞生长抑制或细胞毒作用。宇宙中的生物活性物质、植物来源的具有生物活性的大量化合物还没有被充分研究。

在所有提到的例子中，是由于进化的力量而不是有机合成化学家的智慧产生了具有高度特异性药理作用的分子种类。其中许多分子是被有机物体利用攻击竞争者或掠夺者。既然这些自然存在的药物难以计数，它们有可能成为未来几十年新的抗肿瘤药物的来源。

一个植物来源产物的例子就是对环巴胺（cyclopamin，西洛帕明）的观察。这个特殊的故事起始于观察到在美国西部高地牧草羊群的小羊有流行性先天畸形，它们大多数生下来就死产。主要的畸形是独眼畸形——中间单眼（cyclopia，这一名字来源于神话中的独眼巨人 Cyclos）。

1950 年开始的兽医勘探工作发现如果怀孕的母羊在怀孕第 14 天吃了假藜芦（藜芦属，图 16.36A）就会产下独眼的新生羊羔。如果在怀孕早期或晚些时候吃了假藜芦就会出现其他的畸形（如腭裂和短腿）。1968 年之前，对假藜芦引起的致畸效应的追踪研究发现了一种后来称为环巴胺的生物碱（图 16.36B），它能在多数有机体中诱导独眼畸形（图 16.36C）。

许多这些畸形类似于人类胚胎脑两侧对称结构不能正常发育造成的前脑无裂畸形。人类这种畸形胎儿是由于 PTC 受体基因或编码其配体的 *SHH* 基因遗传种系突变引起的。目前已经发现了 23 个不同 *SHH*（sonic hedgehog）突变和 3 个 *PTC*（patched，斑片，*SHH* 功能受体）突变与这一情况有关（通常，250 个人类流产胎儿中有 1 个独眼畸形）。环巴胺这一强烈的致畸药物干扰了 Hedgehog（音猬因子，sonic hedgehog，Hh）活化的信号通路，是人们发现的第一个线索。

在这个信号通路中，Gli 转录因子的前体通常在胞浆中被裂解，使分解产物入核发挥转录抑制因子的作用（图 16.37；也见 5.7 节和 6.12 节）。质膜蛋白 Smo（Smoothened）能保护 Gli 转录因子的前体免受裂解，但这一作用通常被 PTC 受体蛋白通过尚

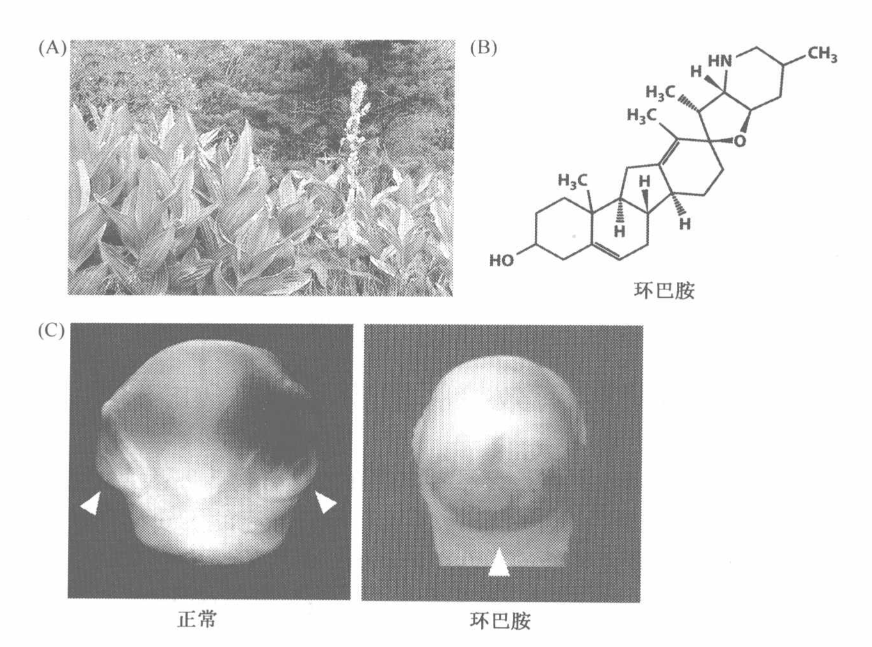


图 16.36 假藜芦和其致畸产物——环巴胺 (A) 植物藜芦属又称假藜芦或玉米百合，生长于美国西部高地牧场。怀孕的母羊吃了这种植物通常会导致羔羊因为脑部主要形态缺陷造成死产，表明这种植物中有潜在的致畸因子。(B) 环巴胺被发现是一致畸因子，它在假藜芦细胞中通过一系列复杂的合成过程而生成。它的结构类似类固醇、雌激素或黄体酮。它结构的复杂性意味着很难用工业上有机化学技术合成其化合物。(C) 用环巴胺处理鸡胚观察脑形成，得到的结果和在所有脊椎动物胚胎观察到的结果一样。如该图所示，这种药物处理后，本应正常出现的两只眼（白箭头，左）被中间退化的单眼代替（白色箭头，右）。(A, from Henriette Kress; C, courtesy of J. P. Incardona and H. Roelink.)

不清楚的机制所抑制。

然而，当 Hedgehog (Hh) 配体与 PTC 结合后，PTC 不再能抑制 Smo 蛋白。Smo 蛋白保护 Gli 蛋白免受正常情况下发生的裂解，完整的 Gli 能运动到核内以锌指结构发挥转录因子作用诱导基因表达。这一信号通路在果蝇和脊椎动物胚胎中涉及广泛的形态发生过程。

在皮肤基底细胞痣综合征中发现编码 *PTC* 基因的种系突变。皮肤细胞的 *PTC* 基因座杂合子丢失 (LOH) 使痣演变为基底细胞癌 (BCCs；见 6.12 节)。此外，至少 40%散发的基底细胞癌（由 UV 辐射引起的最常见的皮肤肿瘤）存在 *PTCH* 基因的失活突变或 *SMO* 基因的活化突变。

（未来疾病发病率项目表明 1994 年后，28%在美国出生的高加索人在他们一生中至少会发生一个 BCC。）幸运的是，这些皮肤癌相对无害和容易治疗。但是与这两个基因的突变等位基因相关的其他肿瘤，尤其是肌细胞和小脑来源的肿瘤（成神经管细胞瘤，图 16.37B）却不是这样。

这个发现的重要意义是发现了这条信号通路的另一种调控失调，主要是发现了一组高表达 Smo 受体的两种主要配体的多种人肿瘤培养细胞，尤其是 India Hh 或 SHh。这

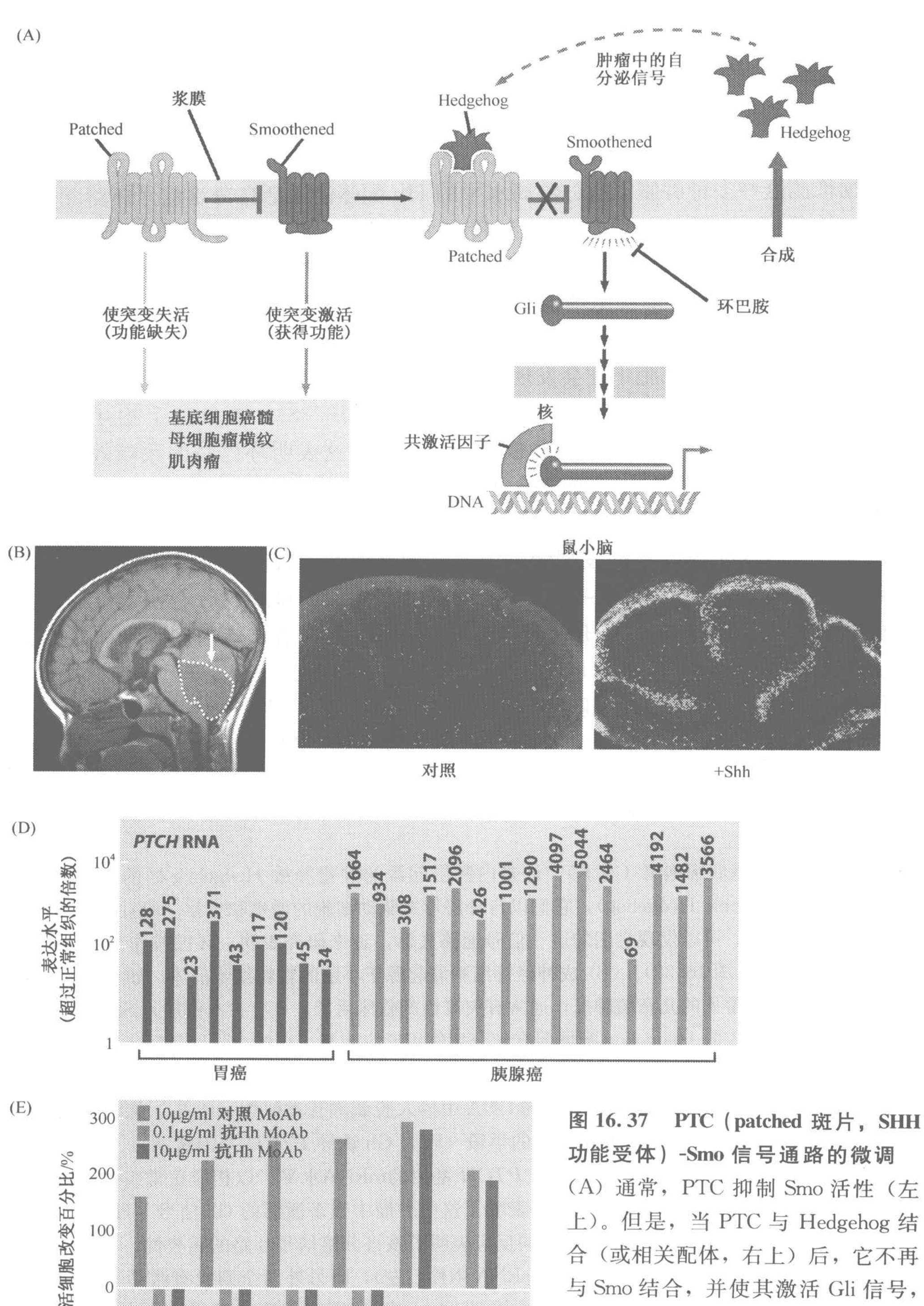


图 16.37 PTC（patched 斑片，SHH 功能受体）-Smo 信号通路的微调 (A) 通常，PTC 抑制 Smo 活性（左上）。但是，当 PTC 与 Hedgehog 结合（或相关配体，右上）后，它不再与 Smo 结合，并使其激活 Gli 信号，Gli 向核内运动，发挥促生长转录因子的作用。Hedgehog 结合的后果可以用缺失 PTC 功能或获得 Smo 功能的突变来模拟，这些改变常见于皮肤

些细胞源于食管、胃、胆管、肺和结肠肿瘤上皮（有意思的是，所有这些肿瘤器官都起源于内胚层），后来又加入了前列腺癌这一非内胚层肿瘤。前列腺肿瘤中，大于70%的肿瘤标本中检出 Hh 类型配体的高表达（在正常上皮细胞中，Hh 配体和其激活的下游信号通路是维持其干细胞自我更新所必需的）。

据推测这些多种肿瘤细胞分泌高水平的 Hh 配体能激活自分泌信号环路并使其持续活化，结果是持续产生完整的具有转录激活功能的 Gli 到肿瘤细胞核内（见图16.37D）。向肿瘤细胞培养基中加入具有中和作用的 Hh 抗体能使细胞增殖停止，这证明了 Hh 有促进某些肿瘤细胞增殖的重要作用（见图 16.37E）。相反，如果加入 Hh 到培养基中则发现其有促有丝分裂的作用（图 16.37C）。正如预期的那样，只有在表达 Smo 受体蛋白的肿瘤细胞中才会发现抗 Hh 抗体对细胞生长有抑制作用和细胞毒作用。

2000 年发现环巴胺能直接抑制 Smo 蛋白（图 16.38），而且这个相互作用阻滞了 Hh 过度合成或 *SMO* 基因突变所造成的异常信号。这表明环巴胺的致畸效应是直接由其在胚胎发育期阻滞 Hh 信号通路的重要环节引起的。而且，发育期间 Hh 信号的缺失与多种肿瘤中这条信号通路的过度激活形成了鲜明对比。

环巴胺与 Smo 相关性的发现随后引发了用环巴胺治疗多种 Hh 阳性的人类肿瘤细胞系的尝试，其能抑制 75%～95%的细胞增殖。例如，对环巴胺有明显反应的培养的人成神经管细胞瘤细胞，是 Hh 信号较强的细胞，反应结果使细胞停止生长，活性丧失。而其他两种脑肿瘤细胞（成胶质细胞瘤和室管膜瘤）对环巴胺无反应。这种治疗对其他未激活 Hh 信号的肿瘤细胞系无作用，表明环巴胺不只是非特异广泛作用的细胞毒剂。另外，对胆囊肿瘤（另一种分泌 Hedgehog 的内胚层肿瘤）小鼠模型的治疗发现肿瘤形成活性完全被环巴胺阻滞（图 16.39A）。

图 16.37（续） 基底细胞癌（左下）。许多内胚层起源的肿瘤释放 Hedgehog 样的配体（右上，如 India Hedgehog，Sonic Hedgehog），它们以自分泌形式驱动细胞的增殖和生存。而且，如果追溯成神经管细胞瘤的起源，可以发现它们的这一信号通路失活。近来研究表明，环巴胺作为 Smo 的拮抗剂阻止其激活 Gli（见图 16.38）。(B) 成神经管细胞瘤起源于小脑的颗粒细胞前体。如 CT 扫描（箭头）所示的肿瘤，它是常见的儿童脑肿瘤，通常有灾难性的临床后果。(C) 在本例加入 Shh 的研究中，小脑的颗粒细胞对加入的 Hedgehog 配体促有丝分裂作用反应明显。小鼠小脑切片显示，加入 Shh 后小脑褶处表面的粒层细胞增殖活性明显增加（右），而处于这一发育阶段的对照切片中的该细胞数目最少（左）。细胞增殖活性（绿）可以通过向 DNA 中掺入脱氧胸苷类似物（BrdU）来测定。(D) PTC 水平提供了直接检测 Hedgehog 通路活性的手段（因为 Gli 诱导 *PTCH* 基因转录）。这里用 RT-PCR 方法在手术切除的胃癌和胰腺癌中检测了 *PTCH* 基因的mRNA水平。以相应正常组织为对照，基因过表达的范围（每一个柱子多出的数目）表明了这些肿瘤中显著激活的 Gli 信号（Hedgehog 通路）。(E) 6 个早期传代培养的胰腺癌细胞的不同反应表明了该自分泌信号环路的重要性。在这 6 个细胞系中，其中 4 个 Gli 信号通路激活（*PTCH* mRNA 阳性，左），而另外两个则没有激活。把能中和 India Hedgehog 和 Sonic Hedgehog 蛋白的单克隆抗体 5E1 加入培养细胞中发现，高 Gli 信号的肿瘤细胞生长和活力被抑制，而无 Gli 信号的肿瘤细胞不受影响。这表明包含 Hedgehog 在内的胞外自分泌环路在促进细胞生长方面的重要性。(B, courtesy of St. Jude Children's Research Hospital; C, from R. J. Wechsler-Reya and M. P. Scott, Neuron 22: 103-114, 1999; D and E, from D. M Berman, S. S. Karhadkar, A. Maitra et al., Nature 425: 846-851, 2003.)

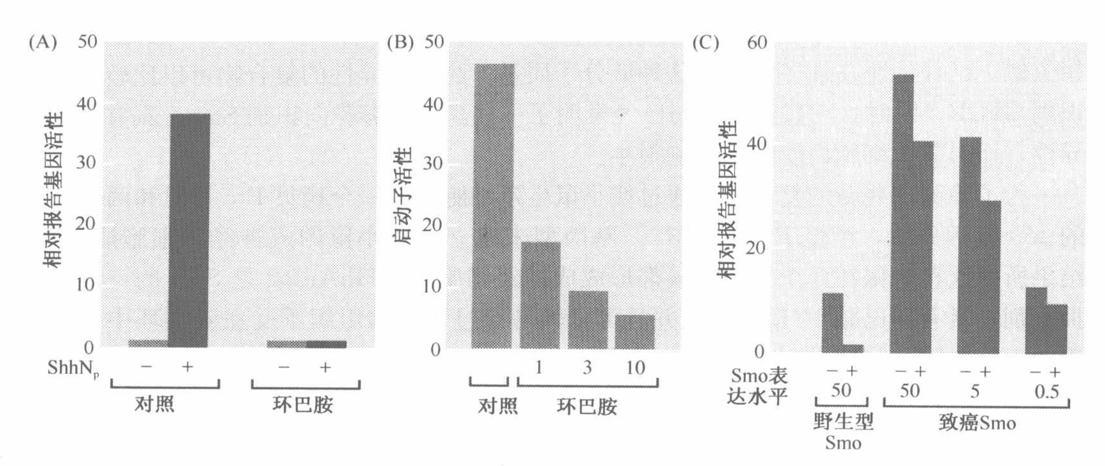


图 16.38 环巴胺对 Patched-Smoothened 信号通路的影响 (A)以上实验表明，Smo 的活性可以通过间接测量报告基因活性来检测，而该报告基因的转录则是由老鼠 NIH3T3 细胞中的 Gli 来调控的。Sonic hedgehog 配体（ShhNp）是 Hedgehog 的一种变体，也是 Patched 受体的配体。在缺乏外加 ShhNp 的情况下，Gli 没有活性（浅绿色柱）。而当加入 ShhNp 后，Gli 的活性则被强烈激活（深绿色柱）。这一诱导可以被环巴胺的处理所逆转（浅粉色，红色柱）。这一情况表明环巴胺可以拮抗 Hh 配体的效应，并且可能位于信号通路中 Ptc 受体的下游。(B) 环巴胺的作用靶点在这个实验中进一步定位。在这一实验中 Gli 的活性（图 A 所检测的）是在 $PTCH^{-/-}$ 细胞中所检测的。Gli 的活性如以前所述可以被环巴胺所抑制，进一步验证了这种药物可能以干扰 Patched 非依赖的一系列下游反应。(C) 当野生型的 Smo 在 NIH 3T3 细胞中高水平表达时，它的活性可以再次被外源性环巴胺的引入所抑制，并且可以通过 Gli 调控的报告基因（蓝色，橘黄色，左侧）的活性来检测。然而，当一个显性作用的突变体起主导作用时，即使癌基因 Smo 表达水平相当甚至略低（右侧柱），它也可以抵抗环巴胺的抑制作用。这表明 Smo 既是位于环巴胺作用的下游，同时也是其直接靶标。接下来的研究建立了一系列的突变体，持续性表达的突变 Smo 蛋白可以抵抗环巴胺的抑制作用，进一步证明了 Smo 与环巴胺存在直接相互作用的观点（图 16.37A）。接下来的生物化学分析显示环巴胺分子与 Smo 能够直接结合（未显示）。(From J. Taipale, J. K. Chen, M. K. Cooper et al., Nature 406: 1005-1009, 2000.)

大约 70% 人胰腺癌存在高水平的 Hh 表达，表明 Hh-Smo-Ptc-Gli 信号通路的活化是这些肿瘤生长程序的内在部分，但是这条信号通路在其他肿瘤和多种正常组织中很少起作用。另外，成年鼠长时间应用治疗剂量的环巴胺至今没有毒性作用的表现。所有这些都可以很好地预示环巴胺将可能作为高效治疗人类肿瘤某些亚型的候选药物，尤其是那些表现出 Hh 信号通路高度活化的肿瘤。

事实上，有三个主要问题动摇了环巴胺作为有效抗肿瘤治疗药物的候选资格。与其他天然产物相类似，环巴胺是一系列复杂酶反应的最终产物，因此很难在有机合成化学实验室来全面概括它的功效；其次，要从 *V. californicum* 中得到足够大量的产物是不实际的；最后，尽管已经在老鼠体内得到了以上结果，但是仍然考虑到环巴胺可能会由于毒性太强而不能应用于人体。

因此，已经发展的替代性 Smo 拮抗剂具有与环巴胺相似的阻断 Hh 信号通路的能力，但却没有毒性。这种替代性拮抗剂是一种细胞表面 7 次跨膜受体，其整体结构与哺

乳动物细胞中许多G蛋白偶联受体（G-protein-coupled- receptor，GPCR，参见5.7节）相类似。已经证明在许多情况下这种低分子质量、高度特异性的复合物可以比较容易地识别GPCR。同时，一些医药公司已经发明了一些药物能够靶向识别Smo，具有高度特异性，而对其他细胞内受体的影响很小。

为了检测这些新的复合物，通过使小鼠生殖细胞中的一个拷贝Ptc基因和两个拷贝的*p53*基因失活，产生$Ptc^{+/-}$ $p53^{-/-}$基因型来建立一种小鼠的成神经管细胞瘤模型。结果所有这种老鼠在3个月的时候都形成成神经细胞瘤。HhAntag是Smo的一种合成抑制剂，具有环巴胺10倍的疗效并且可以轻易穿过保护脑组织不受血液循环中物质侵犯的血脑屏障。如图16.39B所示，利用HhAntag对已经形成成神经细胞瘤的3周龄突变型小鼠进行治疗可以使肿瘤在两周内萎缩，并且只有很小的系统毒性。

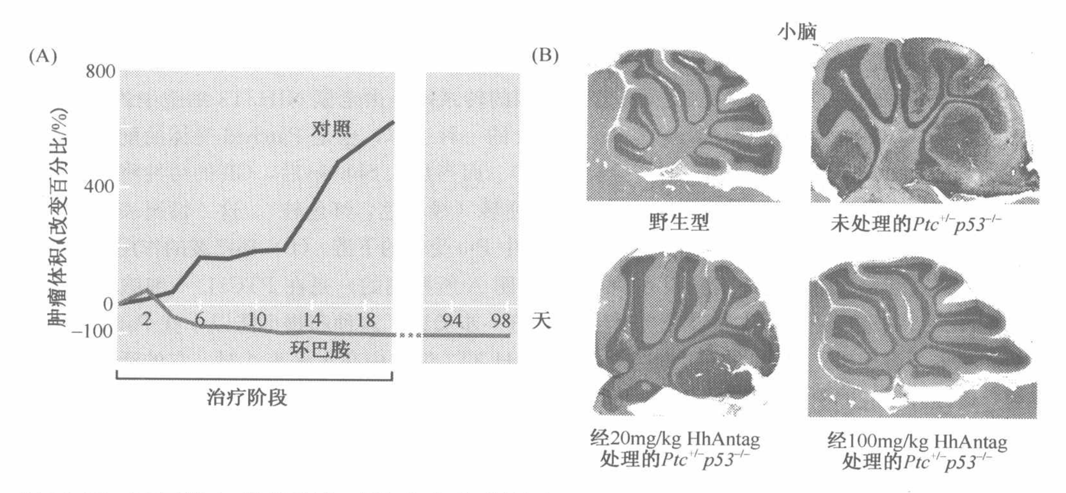


图16.39 环巴胺与类似药物对肿瘤生长的影响 （A）人类胆管肿瘤细胞在小鼠体内形成180mm³的异种肿瘤移植模型：红线所示为未治疗组，蓝线所示为用环巴胺处理22天的治疗组。在后者，肿瘤萎缩，并且撤除环巴胺治疗的76天后仍然没有复发。(B）具有$Ptc^{+/-}$ $p53^{-/-}$基因型的小鼠在它们生命早期就在整个小脑中形成成神经管细胞瘤。在5周龄左右，具有正常基因型的小鼠小脑（左上图）明显小于具有发生肿瘤风险的突变型的小鼠（右上图）。一种叫做HhAntag的拮抗剂，是Smoothened的一种拮抗剂，是通过大规模药物筛选过程鉴定出来的。如果利用这种药物治疗基因突变型小鼠，在它们出生后第3～5周，每天两次，分别以20mg/kg或100mg/kg体重的剂量给药，则可以部分或完全抑制肿瘤（左上和右上图）。接下来利用该药物处置8～10周龄的已经长有较大肿瘤的突变型小鼠也产生了较明显的治疗效果（未显示）。（A，from D. M. Berman，S. S. Karhadkar，A. Maitra et al.，Nature 425：846-851，2003；B，from J. T. Romer，H. Kimura，S. Magdaleno et al.，Cancer Cell 6：229-240，2004.）

对于胰腺癌，开发一种临床有效的Hh信号通路抑制剂是很有希望并且令人兴奋的。目前发现Hh信号通路在胰腺癌的发生发展过程中发挥有重要作用胰腺癌的治疗效果极差，一旦一个患者被诊断为胰腺癌，则其5年存活率将低于4%。与此相比，1998年美国乳腺癌患者的5年存活率为86%，前列腺癌为97%。

成神经管细胞瘤主要发生于儿童，发生率大约为胰腺癌的1/10。现在，虽然几乎2/3的这类肿瘤患者可以通过外科手术、放疗和化疗的联合治疗而治愈，但是这些治疗

常给患者造成一些严重的神经系统损伤，包括认知功能的丧失。有意思的是，开发环巴胺类似物的主要经济动机来源于治疗大多数良性肿瘤和最常见的人类肿瘤类型——皮肤基底细胞癌。

16.15 mTOR这一细胞生理功能的主要调控者是一类很有吸引力的肿瘤治疗靶点

最后的这个故事最简短。因为它仅仅描述了一个尚未完全了解也没有在临床上产生进展的调控环路。尽管如此，这一调控通路却具有产生成功的治疗方法并超过我们前面提及的治疗药物的所有特征。

这个故事也是从讲述一种天然产物雷帕霉素开始的。它是在 19 世纪 60 年代从生长在太平洋中部 Easter 岛屿的 RapaNui 土壤中的链霉菌属 *Hygroscopicus* 细菌中分离出来的。在 70 年代早期的时候，一个药物公司重新将其分离出来，并且将其发展成为一种抗真菌药物。在接下来的几十年里，人们逐渐认识到雷帕霉素（图 16.40）能够抑制很广谱的真核细胞的生长，其中包括从酵母到哺乳动物细胞。

图 16.40 雷帕霉素、FKBP12 和 mTOR 雷帕霉素在化学成分上属于大环内酯类，并且在生物学上被认为是大环内酯类抗生素，这类抗生素主要治疗链球菌属细菌。雷帕霉素和它的化学衍生物可以作为有效的免疫抑制剂，并且不会引起机体内其他器官系统严重的副作用。其发挥功能部分是通过抑制 mTOR 信号通路来实现的。

雷帕霉素还具有较强的免疫抑制能力，甚至仅用一个很低的浓度也可以实现。在 1999 年时，美国食品和药品管理局（FDA）就已经证明它可以用来阻止器官移植时的免疫排斥问题，尤其是肾脏。这种药物还叫做西罗莫司，与其他免疫抑制药物协同发挥作用，尤其是环孢霉素 A 和类固醇，从而保证长时间的移植物移入不会引起移植者的严重副反应。至于其选择性的影响免疫系统的原因仍然不是很清楚（有趣的是，环孢霉素 A 在器官移植受者体内引起的免疫抑制作用可以导致发生恶变的风险）（见 15.9 节）。但是雷帕霉素在这些患者中引起的免疫抑制事实上却降低了移植后淋巴增生紊乱的危险。因此，应当重新认识免疫抑制剂会增加肿瘤风险的说法，因为有的免疫抑制剂会产生肿瘤而有些则不会。

生化实验发现雷帕霉素直接与低分子质量蛋白 FKBP12（FK506-结合蛋白 12kDa）结合。FKBP12 是与 FK506 功能相似的药物，它的发现也是源于它能与 FK506 结合。雷帕霉素-FKBP12 复合体一旦形成，它就会与 1994 年鉴定的蛋白 mTOR（哺乳动物的雷帕霉素靶点）相互作用，并使其关闭。mTOR 是一个大蛋白（289kDa），具有丝/苏氨酸蛋白激酶功能，其激酶结构域与 PI3 激酶和相关激酶的结构域相似。

mTOR 作为哺乳动物细胞控制回路中的关键节点引起了人们的兴趣（图 16.41A）。

mTOR 与包括营养物质可用性和分裂原在内的多种输入信号整合，控制葡萄糖的输入和蛋白质的合成。更特异的是，mTOR 磷酸化两个关键的翻译调节因子：P70S6 激酶（S6K1）和 4E-BP1。这种磷酸化首先激活 S6K1，接着磷酸化核糖体小亚基的（40S）S6 蛋白，使这个亚基形成核糖体（与核糖体的大亚基相互作用）并参与蛋白质的合成。

另外，mTOR 可以通过磷酸化 4E-BP1 使其释放出关键翻译起始因子 eIF4E（真核起始因子 4E）；eIF4E 一旦被释放后将与多种其他的起始因子结合，使核糖体开始翻译特定的 mRNA，尤其是那些 5′非翻译区有寡聚嘧啶的 mRNA。如上所述原因使 mTOR 成为调节细胞生长的关键因子（而不是调节细胞增殖，见图 8.2）。

直到最近还一直认为 mTOR 是一种 Akt/PKB 下游底物，具体说 Akt/PKB 是通过 mTOR 来控制蛋白合成从而调节细胞生长的。但是，现在这种情况倒转过来了，认为 mTOR 是 Akt/PKB 上游的一种关键活化因子（补充材料 54 ◎）。一种关键的上游活化子。这一转变把 mTOR 置于细胞中一个非常强大有力的位置。通过调控 Akt/PKB，mTOR 除了调节细胞生长以外还可以调节细胞凋亡和增殖。

事实上，因为 mTOR 可以分别与称为 Raptor 和 Ritor 的两个可选择分子相互作用，所以图 16.41A 所描绘环路中的 mTOR 可以存在于两个位置。生长因子通过尚不清楚的方式调节mTOR-Rictor复合体（还有第三个蛋白GβL存在），并且能够进一步激活 Akt/PKB。已经研究比较清楚的 mTOR-Raptor 复合体（＋ GβL）能够激活蛋白合成（通过磷酸化 S6K1 和 4E-BP1）。雷帕霉素加入细胞后与 FKBP12 一起直接作用于 mTOR-Raptor 复合体，迅速抑制其功能。当雷帕霉素作用几小时后关闭 mTOR-Rictor 复合体的功能后 Akt/PKB 就也被抑制了。雷帕霉素抑制 mTOR-Rictor 复合体的机制至今还不清楚。

对 Akt/PKB 信号的抑制作用可能是雷帕霉素对过表达活化 PI3K 或缺失 PTEN 的肿瘤细胞产生作用的原因。于是很合情合理地，这种细胞与有 EGF 受体突变并对 Akt/PKB 信号通路成瘾的小细胞肺癌细胞相信，一旦雷帕霉素或相关药物剥夺了该信号，细胞立即倾向于凋亡。但是，决定雷帕霉素治疗敏感性的具体机制有待进一步的研究。

图 16.41A 显示的调节回路与另外的肿瘤发病机制有交叉。例如，在这本书中介绍了 TSC1 和 TSC2（又叫 hamartin 和 tuberin）作为肿瘤抑制蛋白的作用，其中任何一种蛋白的缺失都能导致结节性硬化（表 7.1）；并且，如图 8.2 所示，TSC1 缺失在人和果蝇中都能产生巨大细胞。TSC2 对 Rheb（一种类似 Ras 的蛋白）有 GAP 作用（GT-Pase 活化蛋白，见信息栏 5.11）。一旦 Rheb 处于 GTP 结合状态，它就会通过一种不明方式激活 mTOR-Raptor-GβL 复合体；但是，当 TSC2 诱导 Rheb 水解其 GTP 后，Rheb 就失去这种活性。在开始的研究中，人们忽略了与 mTOR 回路有联系的其他信号及诱导生长和有丝分裂的关键蛋白。

雷帕霉素有多种衍生物，其中三种正在进行早期临床试验。它们的发展令人倍受鼓舞，部分原因是通过观察器官移植受体可以耐受长期服用雷帕霉素类似药物，表明存在

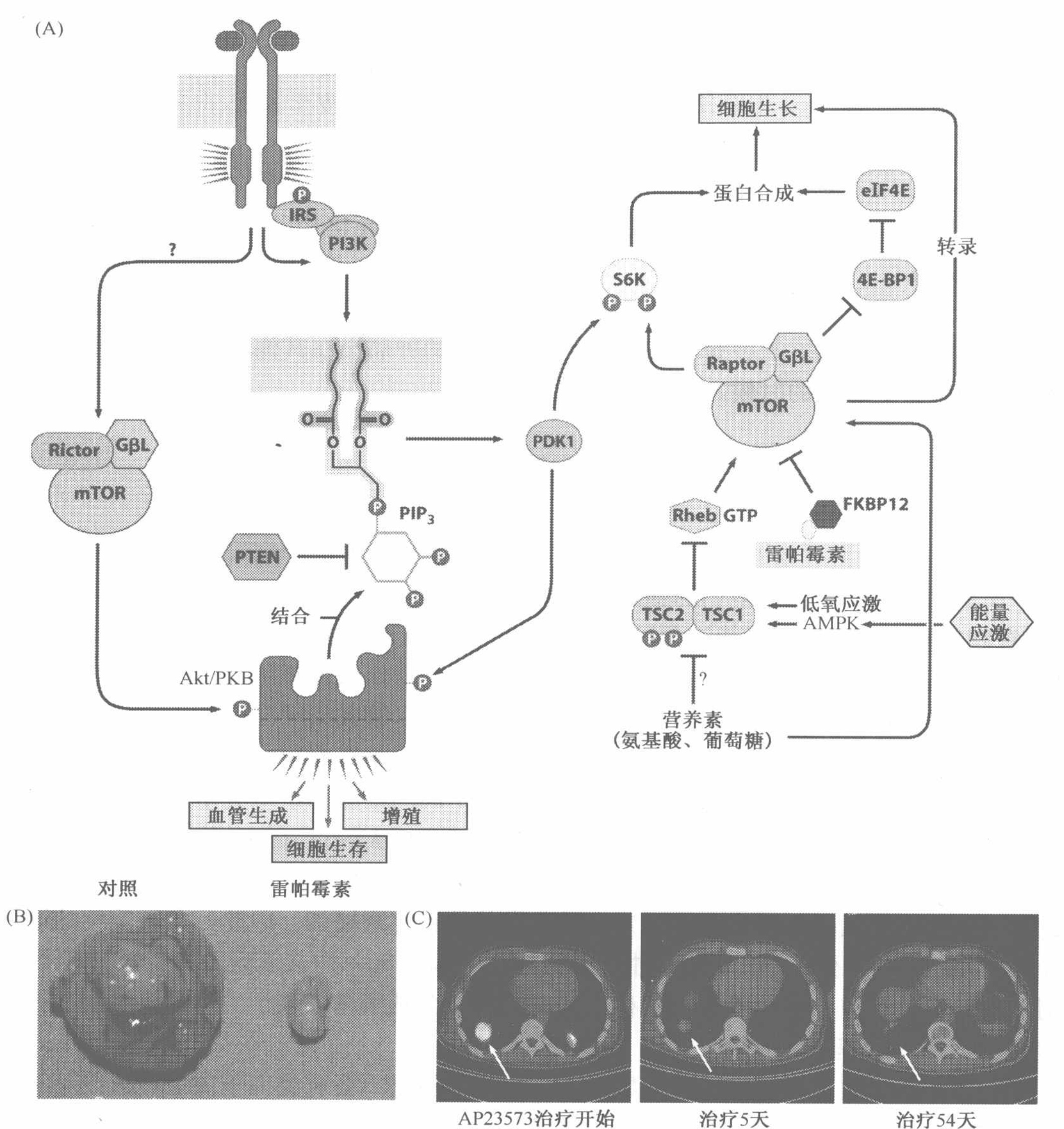


图 16.41 mTOR 回路和肿瘤对 mTOR 抑制剂的反应 （A）mTOR 位于复杂调节回路的中部中间环节，整合多种传入信号，如营养物质可用性、氧张力、ATP 水平、促有丝分裂信号，并对其产生反应，释放信号控制核糖体的生物合成、蛋白质合成、细胞增殖、保护细胞免于凋亡、血管增生，甚至细胞运动。运动信号。mTOR 由 Rictor（左）和 Raptor（右）两个部分组成，以两种不同的形式存在；这两个复合体相互作用的方式至今还不清楚。mTOR-Rictor 复合体通过向 Akt/PKB 中加入功能非常重要的第二个磷酸来控制其下游多种效应因子。雷帕霉素能迅速抑制 mTOR-Raptor 复合体（右下），并且经过一段时间后使 mTOR-Rictor 复合体进行性关闭。（B）BALB/c 小鼠注射同基因型结肠腺癌细胞系后 35 天后形成体积较大、血供良好的肿瘤（左）。但是应用雷帕霉素以相当于对人产生免疫抑制的剂量对小鼠（对人是一种免疫抑制剂）持续治疗一周后，肿瘤比对照组明显缩小（右），并且肿瘤中微血管的密度不到对照组的一半（未显示）。（C）骨肉瘤通常对多种化疗不敏感。但是对一位 23 岁的骨肉瘤患者用 AP23573（一种雷帕霉素类似物）治疗 5 天后，使转移灶中的放射标记葡萄糖最大标准摄入值（SUV_{max}）降低 50%以上，治疗 54 天后该值大于 85%（白色箭头）。虽然这种反应并不典型，但它们展示了这种治疗方法的潜力以及未来在这些患者中找到产生类似反应的特定人群。图中的每一幅图像是将 CT（计算机 X 射线体层扫描）和 PET（正电子体层扫描）原始影像融合后而成的。后者显示的是摄取放射标记葡萄糖的程度。在肿瘤组织中这种摄取程度通常较高。（A，from D. A. Guertin and D. M. Sabatini，Trends Mol. Med. 11：353-361，2005；B，from M. Guba，von Breitenbuch，M. Steinbauer et al.，Nat. Med. 8：128-135，2002；C，courtesy of S. P. Chawla and K. K. Sankhala，Century City Doctors' Hospital and John Wayne Cancer Institute，and of C. L. Bedrosian，Ariad Pharmaceuticals，Inc.）

的低水平的毒性副作用是可以耐受的。临床前实验发现，给老鼠服用导致慢性免疫抑制剂量的雷帕霉素产生了抑制肿瘤血管生成和肿瘤生长的作用（图 16.41B)。Akt/PKB 三种同工酶之一的 Aktl 主要使内皮细胞及其前体对血管内皮生长因子（VEGF）的刺激产生反应这一现象可以解释以上肿瘤抑制作用。

在一些临床试验中，针对肉瘤的治疗引人注目，有时候临床反应非常明显（图 16.41C)。2006 年又有报道表明雷帕霉素能诱导结节性硬化相关的星细胞瘤退化（图 8.2B)。事实上，药物在临床试验中的反应促使我们在这一章对 mTOR 回路进行讨论。它们提示人们也许有一天能够操纵这一回路诱导肿瘤细胞死亡，从而对实体肿瘤的治疗产生巨大的推动作用。当肿瘤学家认识到哪一类型的肿瘤会在其他联合治疗药物的作用下对雷帕霉素更敏感的时候，这种进步就会产生了。

16.16　总结与展望：挑战与机遇

“何时才能治愈肿瘤?”并不直接参与生物医疗研究领域的肿瘤研究者们经常被问到这个简单又合理的问题。他们的脑海中存在的是其他公共卫生措施的历史。感染性疾病（如脊髓灰质炎和天花）是能被预防的，细菌的感染也通常是能被治愈的。在多数人眼中心脏疾病也有很好的预防方式（补充材料 55 ◎)。为什么肿瘤是这样的与众不同呢?

这本书的内容提供了一些回答这种问题的思路。尽管我们呼吁用统一的概念来描述肿瘤这一单一疾病，但至少在临床肿瘤学家的眼里它们是有着很大的不同的。肿瘤实际上是 100 多种疾病的集合，每一种都能影响身体不同的细胞和组织类型。

病理学的分析能够支持我们这一数字，甚至还要更大一点（如乳腺癌至少有 8 种不同的组织病理分类)。但是，即使是更大的数目也只是让人产生的一种错觉：现在应用的分子诊断，尤其是基因表达阵列导致子分类的数目急剧增加。因此，在新千年的第二个 10 年里，可能还会认识到数百种不同的肿瘤疾病，每一种又表现不同的临床原因和对特定治疗的反应。随着时间的推移，肿瘤的诊断会越来越依赖于生物信息学而不再是接受过训练的病理医生的眼睛。

因此，对有关“治愈”这类问题的最直接的回答是不会有类似于决定性战役胜利的能治愈所有肿瘤的单一重大突破，因为肿瘤并不是一种单一的疾病。相反，还要经过许多小的零星战斗才能逐渐降低各种类型肿瘤的总体死亡率。而且，由于多数肿瘤中有一些共同的特定分子缺陷和病理过程（如血管发生)，所以有时候会伴随地在多种肿瘤的治疗中取得进展。

在预测肿瘤治疗的未来之前，有必要先回顾和评价一下所面临的挑战，①肿瘤的问题有多大，治愈多种类型肿瘤疾病的需要有多么迫切? ②我们在治疗实体肿瘤方面做得如何?

流行病学和人口统计学在一定程度上回答了第一个问题。他们对未来的情况给出了一个清醒的估计。图 16.42 的统计显示肿瘤主要是中老年人的疾病，这个数字正在迅速递增而且还会持续增长，使未来几十年内的肿瘤相关死亡数目不断增加。

同样重要的是，我们用疾病发生频率来检测发病率的方法还很不完善。这在很大程度上使对现在治疗的有效性和将来对治疗的需要的评价变得很复杂。这正如图 16.43 中

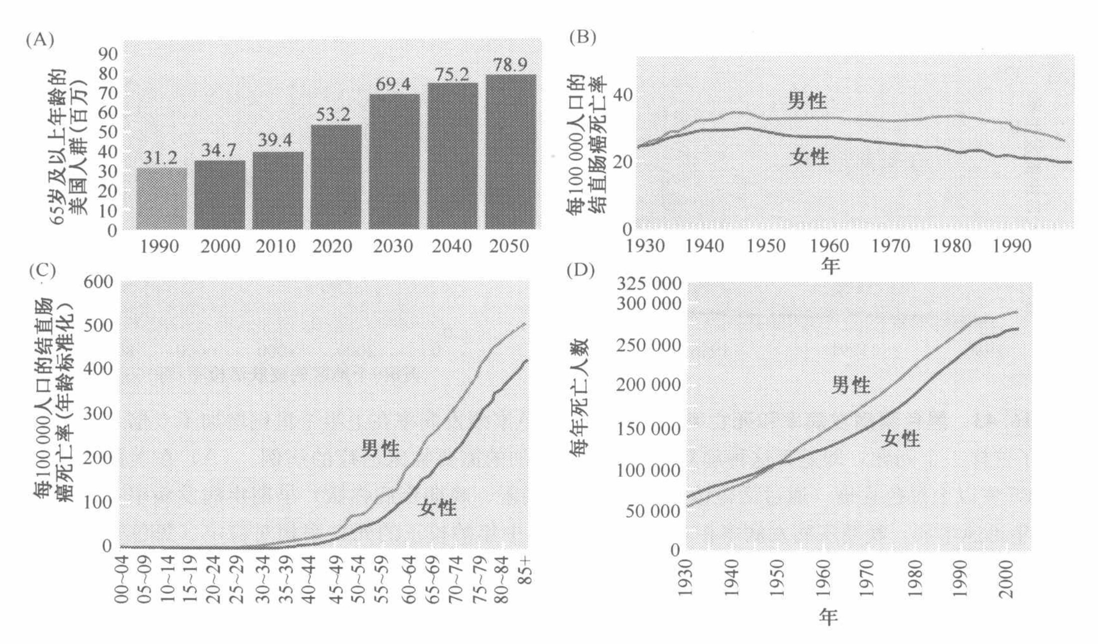


图 16.42　肿瘤的人口统计和流行病调查　(A) 由于中年死亡率的迅速下降，工业国家人口迅速老年化。在美国，从 1900 年以来，65 岁以上人口数量增加了 11 倍，但是 65 岁以下增加 3 倍。下一世纪老年人口同样会发生全球可比性的增加。(B) 前几十年中年龄标化的结直肠癌死亡率改变很小。其他多数肿瘤也显示了相似的曲线。(C) 和其他许多疾病一样，肿瘤在年轻人和中年人中很少见，但随后却迅速增加。这里显示的是结直肠癌的年龄依赖死亡率。(D) 肿瘤死亡率增加的原因如下：①老年人口在上世纪稳定增长，并且还将持续下去（见栏 A）；②肿瘤是老年性疾病（栏 C）；③多数肿瘤的年龄标化的死亡率几十年几乎都没有改变（见栏 B），但过去的 75 年里每年死亡的绝对数迅速增长。看来这个趋势还会持续下去，所以工业国家肿瘤病例会持续攀升几十年。[A，courtesy of D. Singer and R. Hodes，from the U. S. Bureau of the Census Projections of 1996；B，courtesy of M. J. Thun，from Cancer Statistics，2003，American Cancer Society；C，from A. Jemal，T. Murray，E. Ward et al.，CA Cancer J. Clin. 55：10-30，2005；D，from A. Jemal，E. M. Ward and M. J. Thun，in V. DeVita et al. (eds.)，Cancer：Principles and Practice of Oncology，7th ed. Philadelphia：Lippincott/Williams & Wilkins，2004.]

指出的那样，某一特定肿瘤的发病率的计算受诊断方法的影响很大。

对多数肿瘤来说，看得越多，发现的也就越多。图 16.43 中的统计结果表明在过去，多数肿瘤没有症状也没有被诊断，由于对这部分肿瘤的感知使疾病发病率增加，这在常见的肿瘤（如乳腺癌和前列腺癌）更为明显（这里主要的例外是和烟草有关的肿瘤，它的发病率增长是真的不容争辩的，因为发病率几乎和死亡率平行）。这种统计结果表明确实有大量的肿瘤需要治疗，尽管我们还不知道这个数量到底有多大（见信息栏 16.4）。

图 16.43 中的数据也动摇了曾在多数肿瘤生物学家和肿瘤科医生头脑中的这一观念（见第 11 章）：良性生长的肿瘤迟早有发生高度恶变的危险。肿瘤流行病学让我们面临着多种可能性：许多类型的早期肿瘤，包括那些常见肿瘤的早期阶段，都不太可能在人的平均寿命期间内进展至高度恶性阶段。不幸的是，我们仅仅刚开始学会如何区分那些

真正需要积极治疗的肿瘤和那些不需要积极治疗的肿瘤（图 16.4）。

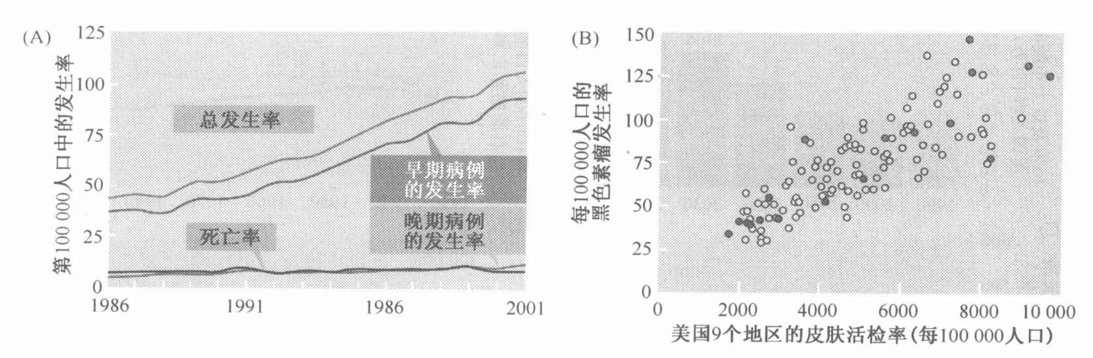


图 16.43 黑色素瘤发病率和死亡率 在美国，黑色素瘤发病率在上半个世纪增加了 6 倍，同时产生了这样一个问题，即是否这种趋势产生了相对增加的需要临床治疗的病例。（A）在美国 9 个地区 65 岁以上黑色素瘤（通过活检诊断、早期疾病局限、晚期疾病弥撒）早期疾病发病率在过去的 20 年迅速增加，晚期疾病发病率相对稳定。这些年中年龄校正的死亡率相对稳定（黑色素瘤这种疾病发病率随年龄渐增，年龄是这种疾病发病率和死亡率的支架）。这些资料中产生了一个问题，即是否早期疾病的真实发生率在过去的时间内真的升高了，还是真实的发病率并没有升高，只是由于筛查方法的改进使登记在册的疾病发生率增加了。（B）如果将图区 A 所示的发病率做成点状图与美国 9 个地区在不同时间点的黑色素瘤的筛查率相比较，可以通过散点图发现两者有非常相近的相关性。这强烈地提示我们疾病的发生率受诊断方法的影响非常大。对这一现象的可能解释是：①在过去的 20 年中致死性黑色素瘤（图区 A）的真实发病率没有发生明显改变；②真实发病率已经增加了，只是由于疾病筛查的加强使早期肿瘤在进展至侵袭与转移以前就被切除了，造成过去 20 年的该病死亡率保持在 20 年前的水平。（From H. G. Welch，S. Woloshin and L. M. Schwartz，BMJ 331：481，2005.）

信息栏 16.4 能够威胁到生命的肿瘤的真实发生率如何？ 类似于图 16.43 所示的资料可能表明了过去 20 年致死性黑色素瘤的年龄标化发生率没有发生改变。在发达国家已经普及的黑色素瘤筛查使发现的患者人数增长，在以前这种情况是不被注意，或不会进展至高度恶性阶段的。这提示我们，对黑色素瘤和其他早期恶性肿瘤筛查，对降低恶性肿瘤的死亡率没有多大的好处。

但也有另一种同样比较合理的观点，那就是在过去的几十年中致命性的黑色素瘤（暴露于阳光下产生的结果）的发生率确实增加了，但由于筛查后能使肿瘤在随时间进展至高度恶性状态以前就被切除了，因此筛查防止了死亡率的增长。例如，在澳大利亚的部分地区，黑色素瘤筛查在过去的 30 年中已经广泛普及，而那里最近几年的黑色素瘤年龄标化死亡率确实是下降了。很明显的是，1950 年以后出生的人群的该病死亡率大大降低了，因为那时才第一次广泛认识到紫外线照射的危险。但即使是这一统计学的结果也存在着不同的解释：是对紫外线的预防（以防晒液和有皮肤保护的户外地区）而不是疾病筛查降低了该病的死亡率。

这两种情况下都很清楚的是现有的黑色素瘤和其他一些相对常见肿瘤的发生率都是很不准确的，它因受到降低肿瘤相关死亡率措施的影响而变得非常复杂。因此，随着检查技术的提高（见图 16.3），被发现时有机会进展至高度恶性的肿瘤的比例可能会下降。越来越多的肿瘤在没有机会经其自然生长过程证明为良性就已经接受了治疗。这一趋势使那些进行多种类型肿瘤治疗的人们进入了进退两难的境地：需要治疗的绝对病例数并不清楚，也很难明确区别那些需要积极治疗的病例和那些可被忽略或最多需要“观察等待”的病例。

至于第二个与当前肿瘤治疗疗效有关的问题，是建立在许多患者能够长时间带瘤生存这一事实的基础之上。这提供了一种验证肿瘤治疗确实发生了进展的手段。然而，有一些我们感觉得到的治疗进展又一次成为筛查增加和更敏感的检查技术应用所造成的假象。这些新的检查技术能越来越多地发现相对处于进展阶段早期的肿瘤，这就造成无论是否进行治疗，都为患者提供了肿瘤通过自然病程进展至晚期之前的更长的生存时间（图 16.44）。

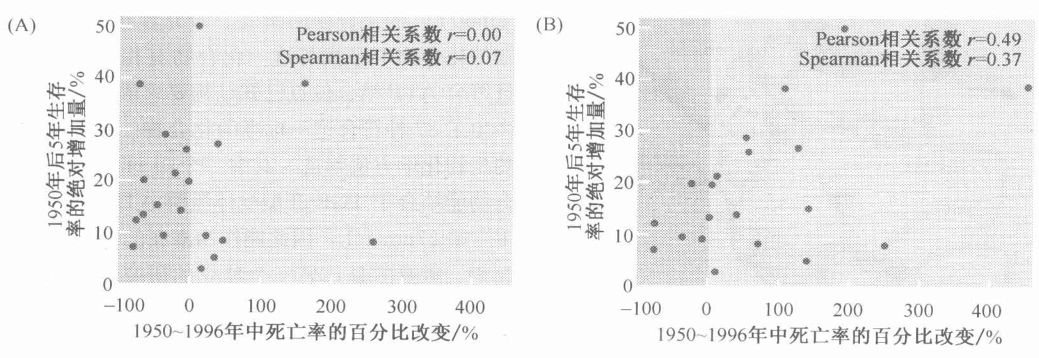


图 16.44 美国 1950 年以来肿瘤发病率和生存情况 评价对一种肿瘤治疗的有效性通常计算从第一次确诊开始存活了 5 年的患者比例。(A) 如果确诊后患者存活时间的延长能够反映治疗疗效增加，那么这一存活时间的延长应与过去半个世纪内该病的年龄标化死亡率有相关性。实际上，像我们这里所说的，当把许多实体肿瘤的 5 年生存率和死亡率做成散点图的话并没有发现这两个参数之间的相关性（请注意相关系数很低，右上）。(B) 相反，那么这种时间应和这种肿瘤上半世纪年龄校正死亡率的减少相关。事实上，正如这里指出的，当把一些肿瘤 5 年存活率根据死亡率的变化绘制变化曲线，这两个参数没有相关性（注意低的相关系数，右上）。(B) 5 年生存率与疾病发生率的改变有明显的相关性。如果后者受诊断偏倚（见图 16.43）影响很大的话，那么 5 年生存率就变得很难解释，因为它们可能更主要地反映了在自然临床病程的早期被发现的疾病的情况。(From H. G. Welch, L. M. Schwartz and S. Woloshin, J. Am. Med. Assoc. 282: 2976-2978, 2000.)

通过这一逻辑得出的结论就是治疗效果需要通过设置了精确对照的实验来校准：将患这种恶性肿瘤的人群与平行暴露于其他药物或治疗方案的患者相比较。最近，这种并列比较的对照实验在实体肿瘤的治疗方面看到了越来越多的作用（如图 16.21 所示），但随着新药和单克隆抗体不断引入临床，它还会发生改变。

这里要提到格列卫、贝伐单抗和美罗华（见 13.10 节和 15.20 节）。主要希望这些药物最终能成为将来几十种甚至几百种高效靶向药物的前身。对包括抗体在内高效靶向药物努力开发最终使每年产生的抗肿瘤新药都在稳步增加。采用计算机驱动的处理过程，如高通量的筛查（HTS）、靶分子结构的自动检测和计算机辅助药物分子设计正在推动这一理想走向实现（图 16.45）。

传统上，在临床前和 I 期临床试验的新药是作为单一药物来评估。这一做法和肿瘤研究者的理念相违背，因为除了个别肿瘤以外多数肿瘤的单一药物治疗很难取得好的疗效。临床上依赖多种抗肿瘤药物的联合使用才能取得较好的效果。他们的理论部分基于肿瘤细胞群体的遗传可塑性。正如我们在第 12 章介绍的，肿瘤细胞基因组存在遗传不

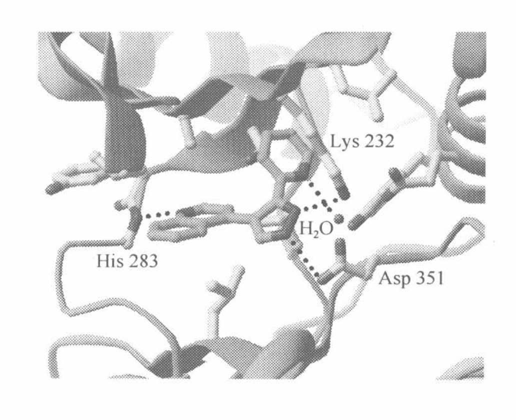


图 16.45 虚拟筛选——在计算机上设计药物 高通量的筛选产生了大量引人注目的候选药物，其中一些已经进入临床试验。但是，将来这种非常昂贵的筛选将会被有效的数学运算所代替，这种运算能够使药理学家根据已知的靶点蛋白的结构设计药物。本图解展示的药物的开发始于对一种能与 TGF-βI 型受体激酶 ATP 结合位点微弱结合（IC50 是 30 μmol/L）的化合物的研究。研究者在 200 000 种已知的化合物中寻找与这一化合物有相同化学特征并且符合 ATP 结合位点已知结构要求的化合物。因此产生了 87 种符合这一标准的化合物。接下来用传统的生物化学方法筛选。其中一个叫 HTS466284 的化合物能结合于 TGF-βI 型受体激酶 ATP 结合位点，其 IC_{50} 是 27nmol/L，因此能作为潜在的 TGF-β 信号抑制剂。重要的是，另一个独立的研究组用传统的高通量筛查方法锁定了相同的抑制剂。氢键用虚线表示。（From J. Singh，C. E. Chuaqui，P. A. Boriack- Sjodin et al.，Bioorg. Med. Chem. Lett. 13：4355-4359，2003.）

稳定性，多数肿瘤中的肿瘤细胞持续产生亚克隆。其中一些会偶然获得对治疗药物的抗性，再次遇到这种药物时即使肿瘤中大多数细胞能被清除，但这些耐药细胞仍然会旺盛成长，用不同机制的两种或更多的药物联合治疗是受到了抗生素治疗细菌的启发。如果单一药物治疗获得性耐药可能性较小（如 10^{-5}），那么获得细胞克隆性耐药对两种药物耐药的可能性就更小，也许是前者可能性的平方（如 10^{-10}）。后一个数值也许比肿瘤中所有细胞数要大，这就使单一细胞同时获得对两种药物耐药的可能性几乎不存在（但是多药耐药的存在又削弱了这一理论的说服力）。

多药耐药理论又进一步被肿瘤发生的多步骤理论所支持。肿瘤细胞可以通过多个遗传或表观的联合改变而获得特定的表型（见图 11.43）。一个很好的例子就是肿瘤中可以同时存在 Ras 信号激活以及 p53 和 PTEN 抑癌信号通路失活。其中任何一个信号通路的改变都降低了肿瘤细胞凋亡的可能。这种抗凋亡作用的重叠需要以这三个通路为靶点的治疗才能将肿瘤消灭（有趣的是，低分子质量的酪氨酸激酶抑制剂可以和单克隆抗体协同作用于共同靶点——EGF 受体，提示我们非常规的联合用药有时可能会产生较好的治疗效应）。

现在，选择药物的单独应用或是联合应用尚建立在对生物学的直觉理解甚至毫无根据的猜测的基础上。在未来的几十年里，我们对人类细胞中信号通路设计的认识不断加速，分子诊断技术将能告诉我们某些肿瘤中特定信号通路在多大程度上受到了干扰，而在别的肿瘤中并没有改变。这些认识上的提高将影响将来多种药物治疗的方案。采用基因表达阵列的功能基因组学研究已经开始改变这些状况，图 16.5 描述的对弥散性 B 细胞淋巴瘤的分层就是这样的分析。

如果候选药物只有与其他药物联合使用才能发挥药效的话，那又怎么办呢？理论上，许多抗肿瘤药物都可以归为这一类，意味着过去已经抛弃了许多真正有效的候选药

物并且以后还会有相同命运的药物。造成这一结果的原因就是我们从来没有检测它们作为联合用药时的治疗效果。这里再一次希望我们对亚细胞信号通路有更深入理解这样将会改善这种状况（见信息栏 16.5）。

信息栏 16.5 法律和财政的限制降低了联合用药实验的可能性 现在，联合用药候选药物实验受到生物学上的困难与财政力量的干扰，这种财政力量经常使药厂不愿意将拥有自主权的药物与竞争对手生产的药物联合应用。专利规则也不鼓励受专利保护的化合物被该专利持有者的竞争对手所间接使用。

过去，在美国组织多药联合的早期临床试验是更困难的，食品药品监督局（FDA）坚决要求提供候选药物单独用于治疗时的临床疗效。安必妥（Erbitux）是一种抗 EGF 受体的单克隆抗体（信息栏 15.4），是第一个被批准与依立替康（irinotecan）一起使用的药物，因为联合使用的效果比依立替康单独使用效果好得多。（依立替康是一种更传统的细胞毒制剂，具有拓扑异构酶 I 抑制剂的功能）。

如 11 章所描述，肿瘤干细胞的发现对抗肿瘤药物的发展产生了另一个大的挑战。能够自我更新的肿瘤干细胞可以产生新的肿瘤，但是它们扩增产生的大量后代细胞的自我更新能力是有限的。这种肿瘤的构筑方式最初只发现于白血病、乳腺癌和脑肿瘤中，但从长时间研究来看，可能大多数人类肿瘤细胞都采用这种构筑形式。

这存在于肿瘤中的等级构筑形式对抗肿瘤药物的开发有重要的提示作用。传统上临床验证这些药物的有效性依赖于它能否阻止肿瘤进一步生长或减小肿瘤体积。许多临床试验中的抗肿瘤药物能够通过清除扩增细胞来缩小肿瘤体积，在肿瘤生长中扩增细胞占肿瘤体积的主要部分。但是，如果这些药物不能攻击有自我更新能力的肿瘤干细胞（见图 16.28），肿瘤就会有再次生长的可能性，临床上迟早会复发。

瘤体内肿瘤细胞的这种构筑方式意味着只有应用的治疗方法能够打击肿瘤的心脏——具有自我更新能力的肿瘤干细胞，才有可能达到肿瘤的长期缓解和治愈。到目前为止，在大多数肿瘤中还没有可以检测到肿瘤干细胞的方法。因此，药物的开发受到限制，原因是缺少一种重要的分析工具来评价真正的治疗效果。

一个仍然没有解决的主要问题就是在临床前药物开发阶段的人类肿瘤生物模型的建立。一些人类肿瘤的异种移植模型能用来预测临床中遇到的肿瘤的生物行为，但是在许多肿瘤中这种方法并不可行（见信息栏 13.2）。如果能够建立具有预测能力的人类肿瘤临床前模型，它将必然减少药物开发的费用，甚至很可能避免某些早期临床试验。而目前，真正有用的动物肿瘤模型仅仅是一个美好的愿望。

肿瘤内的非肿瘤基质细胞可能是决定其对多数药物治疗反应性的主要因素，然而在许多人类肿瘤的临床前模型的设计过程中往往忽略了它们的作用。我们在第 13 章已经知道，一些肿瘤中对放射治疗最敏感的细胞是形成新生血管的内皮细胞（见图 13.47）。另外，越来越表明许多广泛应用的抗肿瘤化学治疗药物可能对肿瘤相关内皮细胞具有很强的作用，而这一点在过去从来没有考虑过。事实上，一些研究者为了优化化疗药物对肿瘤相关新生血管的毒性效应正在重新设计化疗方案。将肿瘤干细胞和肿瘤基质细胞作为化学治疗中相当重要的生物学靶点将必然会改变整个药物开发领域。

对这么多抗肿瘤药物的最终检验就是将其应用于相当数量的肿瘤患者以检测其疗

效。在这里，药物开发者经常会面临着如何知道哪种类型的肿瘤最有可能产生治疗反应的困境。一种候选药物是用于在胰腺癌患者还是用于成神经母细胞瘤患者呢？在这些或者其他类型肿瘤细胞中发现的分子病变看来可以作为非常有用的指示物来帮助我们做出最终决定。但是经常会出现一些情况，一些类型的肿瘤产生的治疗反应并不能由已知生长中所发生的突变基因或信号通路失调来解释，因此临床试验中选择患者还存在着任意性和非优化性。我们只能期望我们对各种不同肿瘤分子病因学认识的逐步增长能够为肿瘤学家提供真正有益的指导。

最终，当前药物开发最大的挑战是要体现出长期的疗效：试验药物是否对延长肿瘤患者寿命有显著作用，以及我们敢不敢信赖该药物会产生长期的疗效？一些肿瘤细胞能通过增加其抗凋亡能力而产生药物逃逸机制。而其他的一些肿瘤细胞可能丧失细胞周期检验点。而细胞周期检验点能够使细胞对特定类型药物治疗产生敏感反应。如果抗体介导的杀伤作用能够在开始的过程中杀死肿瘤中的细胞，那么肿瘤会立刻下调该治疗抗体所识别的抗原的表达水平。相当数量的肿瘤细胞能够通过防止药物在细胞内聚积而产生耐药性。目前尚不确定是否有一天我们能够设计出可以预防肿瘤细胞产生可塑性和逃避能力的治疗方案。这种方案将使长期以来不能治愈的恶性肿瘤达到明确的终生治愈。

除了药物开发和试验，人类肿瘤细胞的复杂生物学特征是我们要面临的更大的挑战。是否要针对不同类型的肿瘤开发不同类型的药物？还是少数的治疗方案就能取得较广泛的适用性？是否需要根据肿瘤的特殊基因型和表型为一个特定群体（如结肠癌）中的不同肿瘤制定不同的、个性化的治疗方案？我们是否有一天能够提供患者消费得起的“个性化的分子药物”，让每一个肿瘤患者的详细特征和基因构成信息决定其治疗方案？

抗肿瘤药物能否只杀伤恶性生长细胞而对正常组织只产生很小的副作用？药物设计者是否应尝试开发能够控制肿瘤而不是彻底消灭肿瘤的药物？因为完全治愈多种肿瘤的目标难以实现，所以将一些肿瘤变为慢性并且可以耐受的疾病可能是更为现实的目标(这也是正在开发新型抗 HIV 治疗药物研究者的想法)。

2004 年对人类肿瘤细胞基因组进行突变基因普查圈定了 291 个不同的基因，占人类基因组中基因总数的 1.5%（图 16.46）。其中 228 个在肿瘤中是体细胞突变，32 个基因同时存在来源于体细胞和生殖细胞的等位基因突变。毫无疑问这个基因目录还会增加，如这个普查中还没有包括通过启动子甲基化引起肿瘤的基因在内。

这一普查结果为开发新型抗肿瘤药物提供了许多靶点。同时它也给人们出了一个难题。一些基因只在罕发肿瘤中存在突变，开发针对其蛋白产物的治疗药物的巨额费用是不可能通过销售来得到补偿的。而且，目前还不清楚各种类型肿瘤细胞中突变蛋白是如何对肿瘤生长发挥作用的，我们又如何将这大约 300 种已知或怀疑参与了许多肿瘤发生过程的基因的关键功能进行分类呢？我们目前整理和解释人类肿瘤细胞基因组和信号通路的方法还无法完成我们的任务。

许多肿瘤研究者想要了解整个生物系统，如一个活着的肿瘤细胞，而不是细胞某一组分的功能。在他们眼中，着眼于复杂系统中的某一可分离组分的“还原论者生物学”的时代已经结束了，新时代中会将这些已知组分的海量信息整合为复杂的相互作用系统，这一系统的行为将通过生物信息学来预测。

这些努力探索的成果，包括“系统生物学”这一新学科的建立在内，肯定会有益于

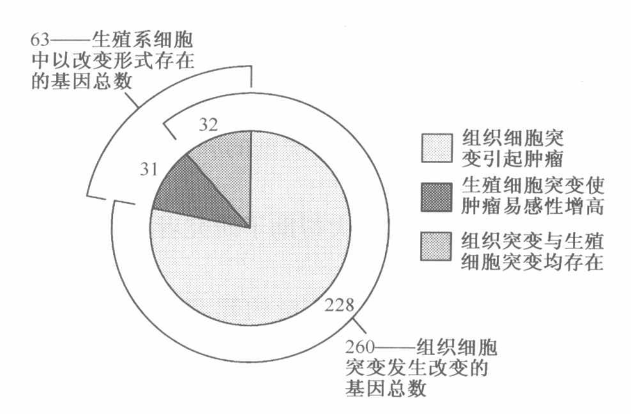


图 16.46 未来肿瘤药物开发的靶点 2004 年进行的肿瘤文献回顾发现，至少有 291 个基因与人类肿瘤有关。其中 260 个已经在人类肿瘤细胞基因组中以等位基因体细胞突变的形式存在。然而，后者中的大部分是间质肿瘤（白血病、淋巴瘤和肉瘤）的体细胞突变，只有 77 个基因是其他类型中常见肿瘤中的突变。按激酶基因在人类基因组中所占的数量比例来计算的话，291 个基因中应有 6 个属于激酶，而实际上却有 27 种。相反，由于 G 蛋白偶联的受体（GPCR）在细胞中大量存在，预期应该至少有 8 种肿瘤相关的该类基因出现，而实际上只有 1 种。(Courtesy of M. R. Stratton.)

肿瘤研究工作。想象许多年后会有一天，包括正常细胞还是恶性肿瘤细胞在内的人体细胞的药物反应都可以通过这些细胞的模型和它们的内部调控环路来预测。这种进步对当前的实验生物学研究有很大帮助，可以使药物开发过程的许多步骤不再必要。如果这真能够成为现实的话，药物开发将更多地成为纯粹的生物信息学工作，而不再是单纯的实验室生物学工作。

但是目前这些想法还都是幻想，是遥远的未来。对现在来说，我们至少需要面对药物开发过程的严酷现实和缺少理想动物模型的现状，我们仍然没有重视细胞环路调节的行为，还要继续面对人类肿瘤的复杂生物学行为。

重要概念

- 分子肿瘤学的研究揭示了许多蛋白，它们的功能失调会导致肿瘤的形成和发展。
- 这些蛋白的分子特征使它们成为引人注目的新抗肿瘤药物的靶点，如单克隆抗体或低分子质量药物。
- 能够被抗体攻击的广受关注的大多数蛋白毫无例外地位于细胞表面或胞外间隙中。
- 能够被低分子质量化合物攻击的靶点大多是拥有药物催化间隙的酶。
- 近来通过低分子质量药物抑制蛋白与蛋白相互作用的研究进展扩大了药物靶点的选择范围。
- 靶点蛋白选择的依据是该蛋白失活后能导致肿瘤细胞增生停止或凋亡。
- 至今开发得最成功的抗肿瘤药物是那些干扰负责促进细胞生长和存活的多种激酶的药物，尤其是干扰受体相关酪氨酸激酶。
- 成功的药物必须要有较高的治疗指数，适当的药代动力学和药效动力学特征，对主要器官系统只有较小的副作用。

- 进行临床 I、II、III 期试验的原因是因为临床前药效和耐受程度的研究很难预测它们在人体的行为。
- 临床用药的指征主要依据肿瘤细胞中靶蛋白（如格列卫的作用机制）的行为特征或相反的主要依赖于经验性地尝试到底各种类型的肿瘤对治疗的反应如何（如 Velcade 的作用机制）。
- 将表面上相似的肿瘤进行亚型分层大大帮助了研究者和临床工作者们选择针对某种肿瘤更有效的药物。
- 诸如格列卫之类的药物的优点是它们较广泛的靶点特异性，使之能用于较多类型的肿瘤。

思考问题

1. 能够作用于广泛分子靶点的药物的优点和缺点是什么？
2. 这本书中描述的大量的、异质性的信号分子的集合，它们在不同肿瘤的发生中发挥着关键的作用。你认为除了充分研究的激酶以外的哪类分子可能会成为新一代抗肿瘤治疗药物的靶点。
3. 肿瘤是如何由特定的癌基因形成而启动，并在随后的肿瘤进展中又不依赖于该癌基因的？
4. 你能够采用什么方法发现经过延长治疗的肿瘤中的细胞已经变得耐药？
5. 既然已经认为自然界中的天然产物是潜在抗肿瘤药物的丰富来源，那么寻找和检测这些药物的障碍是什么？
6. 有些种类的肿瘤只占肿瘤人群总数的很小一部分，开发针对这小部分肿瘤的抗肿瘤药物所面临的障碍是什么？
7. 在未来的肿瘤临床中，为个体肿瘤患者所“量身制定”的抗肿瘤治疗中应包含哪类信息？
8. 你将采用什么方法来建立人类肿瘤的临床前模型，使其能很好地用于预测患者对候选药物的反应？

参考读物

Adams J (2004) The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer* 4, 349–360.

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M et al. (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 43–47.

Baselga J & Arteaga CL (2005) Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 2445–2459.

Bernardi R & Pandolfi PP (2003) Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 22, 9048–9057.

Brunner RB, Hahn SM, Gupta AK et al. (2003) Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Res.* 63, 5656–5668.

Chabner BA & Roberts TG Jr (2005) Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 65–72.

Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-κB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758–765.

Cleator S & Ashworth A (2004) Molecular profiling of breast cancer: clinical implications. *Brit. J. Cancer* 90, 1120–1124.

Courtneidge SA (2003) Escape from inhibition. *Nature* 422, 827–828.

Downward J (2003) Targeting Ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344, 1031–1037.

Duensing A, Medeiros F, McConarty B et al. (2004) Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 23, 3999–4006.

Elrick LJ, Jorgensen HG, Mountford JC and Holyoake TL, (2005) Punish the parent not the progeny. *Blood* 105, 1862–1866.

Felsher DW (2004) Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 37–42.

Futreal PA, Coin L, Marshall M et al. (2004) A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* 4, 177–183.

Gibbs JB (2000) Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287, 1969–1973.

Gills JJ, Granville CA & Dennis PA (2004) Targeting aberrant signal transduction pathways in lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* 3, 147–155.

Gingras A-C, Raught B & Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15, 807–826.

Guertin DA & Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol. Med.* 11, 353–361.

Hideshima T (2002) NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277, 16639–16647.

Hingorani SR & Tuveson DA (2003) Targeting oncogene dependence and resistance. *Cancer Cell* 3, 414–417.

Ince TA & Weinberg RA (2002) Functional genomics and the breast cancer problem. *Cancer Cell* 1, 15–17.

Kamb A. (2005) What's wrong with our cancer models? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4,161–165.

Klein S, McCormick F & Levitzki A (2005) Killing time for cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 5, 573–580.

Kloog Y & Cox AD (2004) Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin. Cancer Biol.* 14, 253–261.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139.

McCormick F (2001) Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat. Rev. Cancer* 1, 130–141.

Mendelsohn J & Baselga J (2003) Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 2787–2799.

Nahta R, Hortobágyi GN & Esteva FJ (2003) Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist* 8, 5–17.

Piazza F, Gurrieri C & Pandolfi PP (2001) The theory of APL. *Oncogene* 20, 7216–7222.

Ramaswamy S & Golub TR (2002) DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.* 20, 1932–1941.

Rothenberg ML, Carbone DP & Johnson DH (2003) Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 3, 303–309.

Salesse S & Verfaillie CM (2002) BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 21, 8547–8559.

Sawyers CL (1999) Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340:1330–1340.

Sawyers CL (2003) Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes Dev.* 17, 2998–3010.

Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432, 204–207.

Schlessinger J (2005) SU11248: Genesis of a new cancer drug. *The Scientist* 19, 17–18.

Scott MP (2003) A twist in hedgehog's tale. *Nature* 425, 780–782.

Sebolt-Leopold JS & Herrera R (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 937–947.

Sebti S & Der CJ (2003) Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 3, 945–951.

Segal E, Friedman N, Kaminski N et al. (2005) From signatures to models: understanding cancer using microarrays. *Nat. Genet.* 37:S38-S45.

Shah NP & Sawyers CL (2003) Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22, 7389–7395.

Shawver LK, Slamon D & Ullrich A (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117–123.

Staudt LM (2003) Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 348, 1777–1785.

Strausberg RL, Simpson AJ, Old LJ & Riggins GJ (2004) Oncogenomics and the development of new cancer therapies. *Nature* 429, 469–474.

Weigelt B, Peterse JL & van't Veer LJ (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602.

Vande Woude GF, Kelloff GJ, Ruddon RW et al. (2004) Reanalysis of cancer drugs: old drugs, new tricks. *Clin. Cancer Res.* Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B & Orlowski RZ (2003) The proteasome as a target for cancer therapy.

Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B & Orlowski RZ (2003) The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 9, 6316–6325.

Zwick E, Bange J & Ullrich A (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol. Med.* 8, 16–23.

（林　晨　钱海利　马　飞　于　静）

缩 略 语 表

缩略语	英文全称	中文翻译
A	(1)adenine;(2)adenosine	(1)腺嘌呤;(2)腺苷
ABC	activated B-cell-like subtype of DLBCL	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的激活 B 细胞样亚型
ABH	alkB homolog	alkB 同源物
Abl	Abelson leukemia virus oncoprotein	艾贝尔逊(氏)白血病病毒癌蛋白
ACT	adoptive cell transfer	过继性细胞迁移
ACTH	adrenocorticotropic hormone	促肾上腺皮质激素
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用
AEV	avian erythroblastosis virus	鸟类成红细胞增多症病毒
AFB1	aflatoxin B1	黄曲霉毒素 B1
Ag	antigen	抗原
AID	activation-induced cytidine deaminase	激活诱导的胞苷脱氨(基)酶
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	获得性免疫缺陷综合征
ALL	acute lymphocytic (or lymphoblastic) leukemia	急性淋巴细胞白血病
ALT	alternative lengthening of telomeres	端粒延伸替代机制
ALV	avian leukosis virus	禽类白细胞增生病毒
AML	acute myelogenous leukemia	急性骨髓性白血病
AMP	adenosine monophosphate	腺苷一磷酸(盐)
AMV	avian myelocytomatosis virus	禽髓细胞瘤病病毒
Ang	angiopoietin	血管生成素
AP	(1)apurinic;(2)apyrimidinic	(1)无嘌呤;(2)无嘧啶
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1	细胞凋亡蛋白酶体激活因子 1
APC	(1)antigen presenting cell; (2)anaphase promoting complex;(3)adenomatous polyposis coli	(1)抗原呈递细胞;(2)后期促进复合体;(3)腺瘤结肠息肉病
APE	(1)apurinic endonuclease; (2)apyrimidinic endonuclease	(1)无嘌呤内切核酸酶;(2)无嘧啶内切核酸酶
APL	acute promyelocytic leukemia	急性前髓细胞性白血病
ARF	alternative reading frame(protein)	可变读码框(蛋白)
asmase	acid sphingomyelinase	酸化鞘磷脂酶
AT	ataxia telangiectasia (syndrome)	共济失调毛细血管扩张综合征
ATM	mutated in ataxia telangiectasia	运动失调性毛细血管扩张症中的突变
ATP	adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
ATR	ATM-related kinase	ATM 相关的激酶
ATRA	all-*trans*-retinoic acid	全反式维甲酸
AUC	area under the curve	曲线下面积

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
BCC	basal cell carcinoma	基底细胞癌
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (mycobacterium)	分枝杆菌
Bcl-2	B-cell lymphoma gene-2	B细胞淋巴瘤基因-2
BCNS	basal cell nevus syndrome	基底细胞痣
BCR	breakpoint cluster region	断裂点簇集区
BER	base-excision DNA repair	碱基切除 DNA 修复
β-gal	β-galactosidase	β-半乳糖苷酶
β_2m	β_2 microglobulin	β_2微球蛋白
BFB	breakage-fusion-bridge (cycle of chromosomes)	断裂-融合桥
BH	Bcl-2-homologous(domain)	B细胞淋巴瘤基因-2 同源物
BHK	baby hamster kidney (cell)	幼仑鼠肾细胞
bHLH	basic helix-loop-helix(transcription factor)	碱性螺旋-环-螺旋(转录因子)
BL	Burkitt's lymphoma	Burkitt 氏淋巴瘤
BMI	body-mass index	体重指数
BMP	bone morphogenetic protein	骨形态发生蛋白
BMPR1	BMP receptor-1	骨形态发生蛋白受体 1
BMSC	bone marrow stem cell	骨髓干细胞
BMT	bone marrow transplantation	骨髓移植
BP	benzo[*a*]pyrene	苯[*a*]并芘
bp	base pair	碱基对
BPDE	benzo[*a*]pyrenediolepoxide	苯并芘环氧化物
BPV	bovine papillomavirus	牛乳头瘤病毒
BrdU	bromodeoxyuridine	溴脱氧尿苷
BTK	Bruton's TK	Bruton 酪氨酸激酶
C	(1) carboxy (terminus of protein); (2) constant region (of an antibody molecule); (3) cytidine; (4) cytosine	(1)(蛋白的)羧基;(2)(抗体分子)恒定区;(3)胞啶;(4)胞核嘧啶
C′	C(carboxy)terminus;C-terminal(adi.)	羧基端;羧基端的
CA	constitutively active	组成性激活
CAD	caspase-activated Dnase	半胱天冬酶激活的 DNA 酶
CAF	carcinoma-associated fibroblast	癌相关成纤维细胞
CAK	CDK-activating kinase	CDK 激活的激酶
CalB	calcium-phospholipid binding domain	钙磷脂结合区域
cAMP	cyclin adenosine monophosphate	环腺苷酸
CASP	caspase-encoding gene	半胱天冬酶编码基因
CBP	cyclic AMP response element-binding protein	cAMP 反应元件结合蛋白

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
CCK	cholecystokinin	缩胆囊素
CDC	complement-dependent cytotoxicity	补体依赖的细胞毒性
CDH1	E-cadherin	上皮细胞钙黏蛋白
CDK	cyclin-dependent kinase	周期素依赖性蛋白激酶
CdkI	CDK inhibitor	周期素依赖性蛋白激酶抑制子
cDNA	complementary DNA copy of mRNA	信使 RNA 的互补 DNA 拷贝
CEA	carcinoembryonic antigen	癌胚抗原
CEF	chicken embryo fibroblast	鸡胚成纤维细胞
CEP	circulating endothelial progenitor (cell)	循环内皮祖细胞
CGH	comparative genomic hybridization	比较基因组杂交
ChIP	chromatin immunoprecipitation	染色质免疫沉淀
CHOP	cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (chemotherapy protocol)	环磷酰胺、阿霉素、长春花新碱、泼尼松
CI	confidence interval	置信区间
CIITA	class II transactivator (transcription factor)	反式作用子
CIN	(1)cervical intraepithelial neoplasia; (2)chromosomal instability	(1)宫颈上皮内瘤;(2)染色体不稳定性
CIS	carcinoma *in situ*	原位癌
CKII	casein kinase II	酪蛋白激酶 II
CML	chronic myelogenous leukemia	慢性髓细胞性白血病
CMV	cytomegalovirus	细胞巨化病毒
CNL	chronic neutrophilic leukemia	慢性中性粒细胞性白血病
CNS	central nervous system	中枢神经系统
COX-2	cyclooxygenase-2	环氧化酶 2
CPD	cyclobutane pyrimidine dimmer	环丁烷嘧啶二聚体
CPE	cytopathic effect	细胞致病作用
CR	complete response	完全反应
13cRA	13-*cis*-retinoic acid	13-顺式维甲酸
Crkl	Crk-like(*also* CrkL)	Crk 样的
CS	CocKayne syndrome	CocKayne 综合征
CSF-1	colony-stimulating factor-1	集落刺激因子 1
Csk	C-terminal Src kinase	Src 激酶的 C 端
CT	(1)cancer-testis(antigen); (2)computed (X-ray) tomography; (3)chemotherapy	(1)癌-睾丸(抗原);(2)计算机(X 射线)体层照相术;(3)化疗
CTGF	connective tissue growth factor	结缔组织生长因子
CTL	cytotoxic T lymphocyte	细胞毒(性)T 淋巴细胞
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4	细胞毒(性)T 淋巴细胞相关抗原 4

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
CTVS	canine transmissible venereal sarcoma	犬传染性性病肉瘤
CUP	(metastatic) cancer of unknown primary	原发部位不明转移癌
CXCL	ligand of chemokine receptor	趋化因子受体的配体
CXCR	chemokine receptor	趋化因子受体
Cyp	cytochrome P-450 enzyme;*also* CYP	细胞色素 P-450 酶
d5′-mC	deoxy-5′-methylcytosine	脱氧-5′-甲基胞嘧啶
D/D	dimerization domain	二聚体化功能域
dA	deoxyadenosine	去氧腺苷
DAG	diacylglycerol	二酰基甘油
DAPI	4′,6′-diamidino-2-phenylindole	4′,6′-二脒基-2-苯基吲哚
DC	(1)dendritic cell;(2)dyskeratosis congenita	(1)树突状细胞;(2)先天性角化不良症
DCIS	ductal carcinoma *in situ*(of the breast)	原位导管癌
DFS	disease-free survival	无病生存
dG	deoxyguanosine	脱氧鸟苷
Diablo	direct IAP-binding protein with low pI	低等电点的 IAP 直接结合蛋白
DISC	death-inducing signaling complex	死亡诱导信号复合体
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
DM	double minute chromosome	双微染色体
DMBA	dimethylbenz[*a*]anthracene	二甲苯[*a*]蒽
DN	dominant-negative (allele)	显性失活的(等位基因)
DP	differentiation-related transcription factor protein	分化相关的转录因子
DPC4	deleted in pancreatic cancer-4	胰腺癌缺失 4
dR	deoxyribose	去氧核糖
ds	double-stranded(DNA or RNA)	双链 DNA 或 RNA
dTg	deoxythymidine glycol	脱氧胸腺嘧啶核苷乙二醇
DUB	de-ubiquitylating enzyme	去泛素化酶
dUTP	deoxyuridine triphosphate	脱氧尿苷三磷酸
4E-BP	eIF4E-binding protein	eIF4E-结合蛋白
E2F	transcription factor activating adenovirus E2 gene	转录因子激活腺病毒 E2 基因
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
EC	embryonal carcinoma(cell)	畸胎瘤(细胞)
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
EFC-XV	endostatin-like fragment of type XV collagen	XV 型胶原的内皮他丁样片段
EFS	event-free survival	无事件生存
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EGF-R	EGF receptor	表皮生长因子受体

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
eIF	eukaryotic(translation)initiation factor	真核(翻译)起始因子
eIF4E	eukaryotic (translation) initiation factor 4E	真核(翻译)起始因子 4E
EM	electron micrograph (or electron microscope)	电子显微镜
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	电泳迁移率变动分析
EMT	epithelial-mesenchymal transition	上皮-间质转变
ENU	*N*-ethylnitrosourea	*N*-乙基亚硝基脲
env	retrovirus envelope glycoprotein	反转录病毒包装糖蛋白
EPC	endothelial precursor cell; endothelial progenitor cell	内皮祖细胞
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule	上皮细胞黏着分子
EPO	erythropoietin	促红细胞生成素
ER	estrogen receptor	雌激素受体
ERK	extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
ERV	endogenous retrovirus	内源性反转录病毒
ES	embryonic stem(cell)	胚胎干细胞
ESA	epithelial surface antigen	上皮表面抗原
ET-1	endothelin-1	内皮素-1
FA	Fanconi anemia(syndrome)	Fanconi 贫血综合征
FACS	fluorescence-activated cell sorting	荧光激活细胞分选术
FADD	Fas-associated death domain (protein)	Fas 相关的死亡结构域(蛋白)
FAK	focal adhesion kinase	成簇黏附激酶
FAP FasL	(1)familial adenomatous polyposis;(2)fibroblast-activating protein ligand of the Fas death receptor	(1)家族性多发性腺癌;(2)成纤维细胞激活蛋白 Fas 死亡受体的配体
Fc	constant region of an IgG antibody molecule	免疫球蛋白 G 分子的恒定区
FDA	U. S. Food and Drug Administration	美国食品与药品管理局
FDG	2-fluoro-2-deoxy-D-glucose	氟脱氧葡萄糖
FGF	fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
FISH	fluorescence *in situ* hybridization	荧光原位杂交
FITC	fluorescein isothiocyanate (dye)	异硫氰酸荧光素
FKBP12	FK506-binding protein of 12kDa	12kDa 的 FK506 结合蛋白
FL	(1)follicular(B-cell) lymphoma;(2) ligand of the Flt-3 receptor	(1)滤泡性(B 细胞)淋巴瘤;(2)Flt-3 受体的配体
FLICE	FADD-like interleukin-1β-converting enzyme	FADD 样白细胞介素-1β 转化酶
FLIP	FLICE-inhibitory protein	FLICE 抑制蛋白
Flt	Fms-like tyrosine kinase	Fms 样的酪氨酸激酶
FLV	Friend murine leukemia virus	弗里德小鼠白血病病毒
FPT	farnesyl protein transferase	法呢基蛋白转移酶

缩略语	英文全称	中文翻译
FRB	FKBP 12 rapamycin-binding (domain of mTOR)	FKBP12 雷帕霉素结合域(mTOR 结合域)
Frz	frizzled	卷发的
FSH	follicle-stimulating hormone	促卵泡成熟激素
FTI	farnesyltransferase inhibitor	法呢酰基转移霉抑制剂
5-FU	5-fluorouracil	5-氟尿嘧啶
G	(1)guanine;(2)guanine nucleotide;(3)guanosine	(1)鸟嘌呤;(2)鸟嘌呤核苷酸;(3)鸟苷
G_1	gap 1 phase (of cell cycle)	间期 1(细胞周期)
G_2	gap 2 phase (of cell cycle)	间期 2(细胞周期)
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	6-磷酸葡萄糖脱氢酶
GAG	glycosaminoglycan	葡萄糖胺聚糖
gag	group-specific antigen (retrovirus capsid protein)	种群特异性抗原(反转录病毒衣壳蛋白)
GAK	cyclin G-associated kinase	细胞周期蛋白 G 相关的激酶
GAP	GTPase-activating protein	GTP 酶活化蛋白
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	磷酸甘油醛脱氢酶
GBM	glioblastoma multiforme	多形性成胶质细胞瘤
GCB	germinal-center B-cell lymphoma	生发中心 B 细胞淋巴瘤
GDNF	glial cell-derived neurotrophic growth factor	胶质细胞源的神经营养生长因子
GDP	guanosine diphosphate	二磷酸鸟(嘌呤)核苷
GEF	guanine nucleotide exchange factor	鸟嘌呤核苷酸交换因子
GF	growth factor	生长因子
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GGR	global genomic repair	全基因组修复
GH	growth hormone	生长激素
GIST	gastrointestinal stromal tumor	胃肠道间质瘤
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony-stimulating factor	粒细胞巨噬细胞集落刺激因子
gp	glycoprotein	糖蛋白
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白偶联受体
GRP	gastrin-releasing peptide	胃泌素释放肽
GSK-3β	glycogen synthase kinase-3β	糖原合成酶激酶-3β
GSTP1	glutathione-S-transferase π	谷胱甘肽-S-转移酶 π
GTP	guanosine triphosphate	三磷酸鸟(嘌呤)核苷
GTPase	enzyme that cleaves GTP, usually generating GDP	三磷酸鸟(嘌呤)核苷酶
GvH	graft versus host (immunological reaction)	移植物抗宿主反应(免疫反应)
GvT	graft versus tumor (immunological reaction)	移植物抗肿瘤
Gy	Gray (radiation dose unit)	戈(瑞)(放射剂量单位)

缩略语	英文全称	中文翻译
^3H	tritium	氚
h	prefix referring to the human form of a gene or protein	人类基因和蛋白的前缀
H&E	hematoxylin-eosin (tissue stain)	苏木素-伊红(组织染料)
HAMA	human anti-mouse antibody	人抗鼠抗体
HB-EGF	heparin-binding EGF	肝素结合 EGF
HBV	hepatitis B virus	乙型肝病毒
HCA	heterocyclic amine	杂环胺
HCC	hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
hCG	human chorionic gonadotropin	人体绒毛膜促性腺激素
HCL	hairy-cell leukemia	毛细胞性白血病
HCMV	human cytomegalovirus	人巨细胞包含体病毒
HCV	hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HDAC	histone deacetylase	组蛋白脱乙酰基酶
HDM2	human homolog of MDM2	鼠双微基因 2 的人同源物
HDR	homology-directed repair	同源性修复
HEK	human embryonic kidney (cell)	人胚肾细胞
HERV	human endogenous retrovirus	人内源性反转录病毒
HGF	hepatocyte growth factor	肝细胞生长因子
HGPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
Hh	Hedgehog	Hedgehog
HHV-8	human herpesvirus type 8; *also called* Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV)	人 8 型疱疹病毒
HIF	hypoxia-inducible (transcription) factor	低氧诱导因子
HIP1	huntingtin-interacting protein-1	亨廷顿作用蛋白-1
HIV	human immunodeficiency virus	人免疫缺陷症病毒
HLA	human leukocyte antigen (*equivalent to* MHC)	人白细胞抗原
HMEC	human mammary epithelial cell	人乳腺上皮细胞
HNPCC	hereditary non-polyposis colon cancer	遗传非息肉结肠癌
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA	核不均一 RNA
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	头颈鳞状(上皮)细胞癌
HPE	human prostate epithelial (cell)	人前列腺上皮细胞
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	次黄嘌呤磷酸核糖转移酶
HPV	human papillomavirus	人乳头状瘤病毒
HSA	human serum albumin	人血清白蛋白
HSC	hematopoietic stem cell	造血干细胞

缩略语	英文全称	中文翻译
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion	高度鳞状上皮内病损
HSR	homogeneously staining region	同源染色区
HSV-1	herpes simplex virus type 1	1 型单纯疱疹病毒
HTLV-1	human T-cell lymphotropic virus type Ⅰ (or human T-cell leukemia virus)	人嗜 T 淋巴细胞病毒
HTS	high-throughput screening	高效筛选
HU	hydroxyurea	羟(基)脲
IAP	inhibitor of apoptosis	凋亡抑制子
IC_{50}	concentration required to obtain 50%inhibition	半抑制浓度
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase	半胱天冬酶激活的 DNA 酶抑制子
IEG	immediate early gene	早期快反应基因
IEL	intraepithelial lymphocyte	上皮内淋巴细胞
IFN	interferon	干扰素
IFN-R	interferon receptor	干扰素受体
IFG-1	insulin-like growth factor-1	胰岛素样生长激素-1
IGF-1R	IGF-1 receptor	胰岛素样生长激素-1 受体
IGFBP	insulin-like growth factor- binding protein	胰岛素样生长因子结合蛋白
IκB	inhibitor of NF-κB	NF-κB 的抑制子
IKK	IκB kinase	IκB 激酶
IL	interleukin	白细胞介素
ILK	integrin-linked kinase	整联蛋白连接激酶
IP_3	inositol (1,4,5)-triphosphate	纤维醇(1,4,5)- 三磷酸盐
IR	insulin receptor	胰岛素受体
IRK	insulin receptor kinase	胰岛素受体激酶
Jak	Janus kinase	Janus 激酶
JCV	JC virus,a close relative of SV40	JC 病毒
JM	juxtamembrane	近膜区
kb	kilobase	千碱基(对)
kbp	kilobase pair	千碱基对
kD	kilodalton	千道尔顿
KGF	keratinocyte growth factor	角质化细胞生长因子
KIR	killer inhibitory receptor	杀伤细胞抑制受体
KO	knockout;knocked out (gene)	敲除;敲除的(基因)
KSHV	*see* HHV-8	见 HHV-8
LAK	lymphokine-activated killer (cell)	淋巴因子激活的杀伤细胞
LCM	laser capture microdissection	激光捕获显微解剖(法)

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
LDL	low-density lipoprotein	低密度脂蛋白
LEF	lymphoid enhancer factor	淋巴增强因子
LH	luteinizing hormone	促黄体(生成)激素
LIF	leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子
LLC	Lewis lung carcinoma	路易斯肺癌
LOH	loss of heterozygosity	杂合性丧失
LRC	label-retaining cell	标记滞留细胞
LT	large T antigen (of SV40 or polyomavirus)	(SV40 或多瘤病毒的)大 T 抗原
LTR	long terminal repeat (of a provirus)	(前病毒的)长末端(基因)重复
M	mitosis	有丝分裂
m	prefix referring to the murine form of a gene or protein	鼠类基因和蛋白的前缀
M-CSF	macrophage-colony-stimulating factor	巨噬细胞集落刺激因子
MAC	membrane attack complex	膜攻击复合体
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue	黏膜相关淋巴样组织
MAPK	mitogen-activated protein kinase; *also* MAP-kinase	促分裂原活化蛋白激酶;也作 MAP 激酶
MAPKK	kinase that phosphorylate a MAPK	磷酸化促分裂原活化蛋白激酶的激酶
MAPKKK	kinase that phosphorylate a MAPKK	磷酸化 MAPKK 的激酶
3-MC	3-methylcholanthrene	3-甲基胆蒽
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	单核细胞趋化性蛋白 1
mCRP	membrane-bound complement regulatory protein	膜结合补体调节蛋白
MDCK	Maden-Darby canine kidney (cell)	Maden-Darby 犬肾(细胞)
MDM2	mouse double minute chromosome 2	鼠双微染色体 2
MDR	multi-drug resistance (phenotype)	多向性抗药
MDS	myelodysplastic syndrome	骨髓增生异常综合征
MEC	mammary epithelial cell	乳腺上皮细胞
MEF	mouse embryo fibroblast	胚胎成纤维细胞
MeIQx	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline	2-氨基-3,8-二基咪唑[4,5-f]-喹啉
MEK	MAPK/Erk kinase	MAPK/Erk 激酶
MEN	multiple endocrine neoplasia	多发性内分泌腺瘤综合征
MET	mesenchymal-epithelial transition	间质-上皮转变
MGMT	O^6-methylguanine DNA methyltransferase	O^6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶
MHC	major histocompatibility complex (*see also* HLA)	主要组织相容性复合物
MIN	microsatellite instability	微卫星不稳性
MKP	MAP kinase phosphatase	MAP 激酶磷酸酶

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
MLV	murine leukemia virus	鼠白血病病毒
mM	millimolar (10^{-3} molar)	毫摩尔
MM	multiple myeloma	多发性骨髓瘤
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
MMR	mismatch repair (of DNA)	(DNA 的)错配修复
mms	methylmethane sulfonate	乙烷磺酸盐
MMTV	mouse mammary tumor virus	小鼠乳腺瘤病毒
MNNG	*N*-methyl-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidine	*N*-甲基-*N*′-硝基-*N*-亚硝基胍
MNU	*N*-methylnitrosourea	*N*-甲基亚硝脲
MoAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
moca	4,4′-methylenebis(2-chloroaniline)	4,4′-亚甲基双-(2-氯苯胺)
MPNST	malignant peripheral nerve sheath tumor	恶性外周神经鞘瘤
MRI	magnetic resonance imaging	(核)磁共振影像学
mRNA	messenger RNA	信使核糖核酸
MSP	methylation-specific polymerase chain reaction	甲基化特异聚合酶链反应
MT	middle T antigen of polyomavirus	多瘤病毒的中 T 抗原
mt	mutant type	突变体
MT1-MMP	membrane type MMP	膜型间质金属蛋白酶
MTD	maximum tolerated dose	最大耐受剂量
MTH1	*mut* Thomolog-1	突变的 Thomolog-1
MTOR	mammalian target of rapamycin	雷帕霉素的哺乳类靶点
μM	micromolar(10^{-6} molar)	微克分子的(10^{-6}摩尔)
MUP	major urinary protein	严重的尿蛋白
N′	N(amino)terminus; N-terminal(adj.)	N 端; N 端的
NAT	*N*-acetyltransferase	*N*-乙酰转移酶
NBCCS	nevoid basal cell carcinoma syndrome	痣样基底细胞癌综合征
NBS	Nijmegen break syndrome	Nijmegen 断裂综合征
NER	nucleotide-excision DNA repair	核苷酸切除修复
NES	nuclear export signal	核输出信号
Nf/NF	neurofibromatosis	多发性神经纤维瘤
NF-κB	nuclear factor-κB	核因子-κB
NGF	nerve growth factor	神经生长因子
NHEJ	nonhomologous end joining	非同源末端连接
NHL	non-Hodgkin's lymphoma	非何杰金(氏)淋巴瘤
NHPF	normal human prostate fibroblast	正常人前列腺成纤维细胞

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
NK	natural killer (lymphocyte)	自然杀伤(淋巴细胞)
NKT	natural killer lymphocyte expressing T-cell receptor	自然杀伤淋巴细胞表达T细胞受体
NLS	nuclear localization (import) sequence	核定位序列
nM	nano molar (10^{-9} molar)	毫微摩尔(10^{-9}mol)
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁共振
NOD	non-obese diabetic	非肥胖糖尿病患者
NOD/SCID	non-obese diabetic/severe combined immunodeficient	非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷
NotchL	Notch ligand	Notch 配基
NRG	neuregulin	神经调节蛋白
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug	非类固醇类的消炎药
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma	非小细胞肺癌
NTD	N-terminal domain	N 端结构域
OD	optical density	光密度
OHT	4-hydroxy tamoxifen	4-羟基三苯氧胺
OPG	osteoprotegerin ligand	骨保护素配基
OPN	osteopontin	骨桥蛋白
OSE	ovarian surface epithelium	卵巢表面上皮
8-oxo-dG	8-oxo-deoxyguanosine	8-氧(代)-脱氧鸟苷
p	(1)short arm of a chromosome;(2)probability of an event	(1)染色体短臂;(2)事件发生的概率
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon	多环芳(香)烃
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1	纤溶酶原活化抑制因子 1
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia	胰脏上皮内的瘤
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase	多(腺苷二磷酸核糖)聚酶
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PCNA	proliferating-cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PD	(1)pharmacodynamics;(2)population doubling	(1)药效动力学;(2)人口倍增
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板来源的生长因子
PDGF-R	PDGF receptor	血小板来源的生长因子受体
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase1	磷酸肌醇依赖的激酶 1
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PET	positron-emission tomography	正电子发射断层摄影(术)
PFS	progression-free survival	无进展生存期

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
PGE_2	prostaglandin E_2	前列腺素 E_2
PH	pleckstrin homology (PIP_3 binding) (domain)	普列克底物同源物(PIP_3结合结构域)
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b] pyridine	2-氨基-1-甲基-6-苯基亚氨基[4,5-b]吡啶
PhK	phosphorylase kinase	磷酸化酶激酶
PI	(1)phosphatidylinositol;(2) propidium iodide	(1)磷脂酰肌醇;(2)碘化丙啶
$PI(3,4,5)P_3$	*equivalent to* PIP_3	同 PIP_3
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇(-3)激酶
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia	前列腺上皮内的瘤
PINCH	particularly interesting new cysteine-histidine-rich (protein)	新的半胱氨酸-组氨酸富集(蛋白)
PIP_2	phosphatidylinositol (4,5)-diphosphate	(4,5)-二磷酸磷脂酰肌醇
PIP_3	phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate	(3,4,5)-三磷酸磷脂酰肌醇
PK	pharmacokinetics	药物动力学
PKA	protein kinase A	蛋白激酶 A
PKB	protein kinase B	蛋白激酶 B
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PLC	phospholipase C	磷脂酶 C
PLD	phospholipase D	磷脂酶 D
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate (=TPA)	叶啉醇肉豆蔻酸乙酸酯
PMBL	primary mediastinal B-cell lymphoma	原发性纵隔 B 细胞淋巴瘤
PML	(1) promyelocytic leukemia; (2)progressive multifocal leukoencephalopathy	(1)前髓细胞性白血病;(2)渐进性多灶脑白质病
PMN	polymorphonuclear leukocytes/neutrophils	多形核白细胞
PND	paraneoplastic neurological degeneration	类肿瘤性神经退化
pol	(1)polymerase;(2)retrovirus reverse transcriptase	(1)聚合酶;(2)反转录病毒反转录酶
Pol II	RNA polymerase II	RNA 聚合酶 II
6-4PP	pyrimidine(6-4)pyrimidinone photoproduct	嘧啶(6-4) 光产物
PP1	protein phosphatase 1	蛋白质磷酸酶 1
PP2A	protein phosphatase 2A	蛋白质磷酸酶 2A
PR	partial response	部分反应
pRb	retinoblastoma protein	成视网膜母细胞瘤蛋白
PRL	prolactin	催乳(激)素
Pro-B	ALL pro-B-cell acute lymphocytic leukemia	前 B 细胞急性淋巴细胞性白血病
PS	phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
PSA	prostate-specific antigen	前列腺特异性抗原

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
PTB	phosphotyrosine-binding (domain)	磷酸酪氨酸结合(结构域)
PTC	(1)papillary thyroid carcinoma;(2)patched	(1)乳头状甲状腺癌;(2)碎的
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10	10号染色体上磷酸酶和张力蛋白同源物缺失
PTH	parathyroid hormone	甲状旁腺素
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide	甲状旁腺素相关肽
PTP	phosphotyrosine phosphatase	磷酸酪氨酸磷酸酶
PyMT	polyomavirus middle T oncoprotein	多瘤病毒中 T 癌蛋白
q	long arm of a chromosome	染色体长臂
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	定量聚合酶链反应
R	restriction point	限制点
RA	retinol acid	维甲酸
RAG	recombination-activating gene	重组活化基因
RANK	receptor activator of NF-κB	NF-κB 的受体激活物
RANKL	ligand of RANK (receptor)	NF-κB 的受体激活物的配体
RAR	retinoic acid receptor	视黄酸受体
Rb	retinoblastoma protein	成视网膜母细胞瘤蛋白
REF	rat embryo fibroblast	大鼠胚胎成纤维细胞
RFLP	restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
Rheb	Ras homolog enriched in brain	脑中富集的 Ras 同源物
ROS	reactive oxygen species	活性氧簇
RPA	replication protein A	复制蛋白 A
RR	relative risk	相对危险度
RSV	Rous sarcoma virus	劳斯(氏)肉瘤病毒
RT	reverse transcriptase	反转录酶
RTK	tyrosine kinase receptor	酪氨酸激酶受体
S	(1)DNA synthesis phase (of cell cycle);(2)Svedberg (unit of sedimentation in centrifuge)	(1)DNA 合成期;(2)斯韦柏(沉降系数的单位)
SIP	sphingosine-1-phosphate	1-磷酸-鞘氨醇
S6	protein 6 of the small ribosomal subunit	小核糖体亚单位的蛋白 6
S6K1	p70 S6 kinase-1	p70 S6 激酶 1
SA-β-gal	senescence-associated β-galactosidase	衰老相关的 β-半乳糖苷酶
SAHF	senescence-associated heterochromatic foci	衰老相关的异染色质点
SCE	sister chromatid exchange	姐妹染色单体互换
SCF	stem cell factor	干细胞因子
SCID	Severe combined immunodeficiency (syndrome)	重度联合免疫缺陷症

缩略语	英文全称	中文翻译
SCLC	small-cell lung carcinoma	小细胞肺癌
SDF-1	stroma-derived factor-1	间质衍生因子 1
SEM	scanning electron micrograph/microscope/microscopy	扫描电子显微照片/扫描电镜/扫描电子显微术
Ser	serine	丝氨酸
SF	scatter factor; *see* HGF	散射因子
SH1	Src homology 1 domain (tyrosine kinase)	Src 同源物 1 结构域(酪氨酸激酶)
SH2	Src homology 2 domain (phosphotyrosine binding)	Src 同源物 2 结构域(磷酸酪氨酸结合结构域)
SH3	Src homology 3 domain (proline-rich binding)	Src 同源物 3 结构域(脯氨酸富集结合结构域)
SHP	SH2-containing phosphatase	含 SH2 结构域的磷酸酶
SIP1	Smad-interacting protein 1	Smad 作用蛋白 1
SKY	multicolor spectral karyotyping	多色光谱核型分析
Sky1	SR-protein-specific kinase of budding yeast	酵母 SR 蛋白特异激酶
SLE	systemic lupus erythematosus	全身性红斑狼疮
SMA	smooth muscle actin	平滑肌肌动蛋白
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase	第二个线粒体来源的半胱天冬酶激活剂
Smo	smoothened	平滑的
SNP	single-nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
SOD	superoxide dismutase	超(过)氧化物歧化酶
Sos	son of sevenless	鸟苷酸交换因子
Srf	serum response factor	血清应答因子
ss	single-stranded(DNA or RNA)	单链(DNA 或 RNA)
STAT	signal transducer and activator of transcription	信号转导子及转录激活子
Str-1	stromelysin-1	基质分解素-1
STS	staurosporine	十字孢碱
SUMO	small ubiquitin-like modifier	小泛素样调节物
SV	Simian virus	猿猴病毒
T	(1)thymine; (2)thymidine	(1)胸腺嘧啶;(2)脱氧胸腺嘧啶苷
t	referring to a chromosomal translocation	染色体易位
$T_{1/2}$	half-life	半衰期
T_C	cytotoxic T cell	细胞毒(性)T 淋巴细胞
T_H	helper T cell	辅助(性)T 细胞
T_m	melting temperature	解链温度
T_{reg}	regulatory T cell	调节性 T 细胞

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
TAA	tumor-associated antigen	肿瘤相关抗原
T-ALL	T-cell acute lymphocytic leukemia	T 细胞急性淋巴细胞性白血病
TAM	tumor-associated macrophage	肿瘤相关性巨噬细胞
TAP1/2	transporter associated with antigen processing	抗原加工相关转运子
TATA	tumor-associated transplantation antigen	肿瘤相关移植抗原
TCF	T-cell factor	T 细胞因子
TCR	(1)T-cell receptor;(2)transcription-coupled DNA repair	(1)T 细胞受体;(2)转录偶联的 DNA 修复
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase	末端脱氧核苷酰酶酸转移酶
TEL/AML1	chromosomal translocation	染色体易位
TEM	transmission electron microscopy	透射电子显微术
TERT	telomerase reverse transcriptase	端粒末端转移酶
TF	transcription factor	转录因子
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
TGF-α	transforming growth factor-α	转化生长因子-α
TGF-β	transforming growth factor-β	转化生长因子-β
TGF-βR	TGF-β receptor	TGF-β 受体
Thr	threonine	苏氨酸
TIAM-1	T-cell lymphoma invasion and metastasis gene-1	T 细胞淋巴瘤浸润和转移基因 1
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte	肿瘤浸润淋巴细胞
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase	金属蛋白酶组织抑制剂
TK	tyrosine kinase	酪氨酸激酶
TM	transmembrane (domain of a protein)	跨膜结构域
TOR	target of rapamycin	雷帕霉素靶点
TPA	12-*O*-tetradecanoylphorbo1-13-a cetate(=PMA)	12-*O*-十四烷酰佛波乙酸酯-13
TPO	thrombopoietin	血小板生成素
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	TNF 相关的凋亡诱导配体
TRAP	telomeric repeat amplification protocol	端粒重复序列扩增程序
TRF	telomeric restriction fragment	末端着丝粒的限制性片段
tRNA	transfer RNA RNA	转移核糖核酸
TrpRS	tryptophanyl-tRNA synthetase	色氨酰-转移核糖核酸合成酶
ts	temperature-sensitive	温度敏感的
TSA	(1)trichostatin A;(2)tumor-specific antigen	(1)曲古抑菌素 A;(2)肿瘤特异性抗原
TSC	tuberous sclerosis	结节性(脑)硬化
TSG	tumor suppressor gene	肿瘤抑制基因
TSHR	thyroid-stimulating hormone receptor	促甲状腺激素受体

续表

缩略语	英文全称	中文翻译
Tsp-1	thrombospondin-1	凝血酶敏感素 1
TSTA	tumor-specific transplantation antigen	肿瘤特异性移植抗原
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling	TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记
U	(1)uracil;(2)uridine	(1)尿嘧啶;(2)尿核苷
UC	ulcerative colitis	溃疡性结肠炎
uPA	urokinase (type) plasminogen activator	尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂
uPAR	receptor of uPA	uPA 受体
UV	ultraviolet	紫外线
UV-B	ultraviolet-B radiation	紫外线 B 辐射
V	variable region(of an antibody molecule)	可变区(抗体分子)
VEGF	vascular endothelial growth factor (=VPF)	血管内皮(细胞)生长因子
VHL	von Hippel-Lindau	VHL 疾病
VPF	vascular permeability factor (=VEGF)	血管通透性因子(血管内皮生长因子)
VSMC	vascular smooth muscle cell	血管平滑肌细胞
WM	Waldenström's macroglobulinemia	沃尔登斯特伦(氏)巨球蛋白血症
wt	wild type	野生型
XAF1	XIAP-associated factor 1	XIAP 相关因子 1
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis	X 染色体连锁的凋亡抑制子
XP	xeroderma pigmentosum	着色性干皮病

词　汇　表

abasic：指核苷酸丢失了它的嘌呤或嘧啶碱基。

ablate：切除。

abluminal：位于导管腔或其他孔状结构外。

abscissa：横坐标，图的横坐标。

abscission：胞质分裂的最后一步，剩余的链（包括微管产生的）已经分离，允许两个子代细胞完全分离。

acellular：无细胞的，缺乏细胞的。

acetylation：乙酰化，将乙酰转移至另一分子的过程。

acromegaly：肢端肥大症，某些组织过度增生造成的一种病理表现，通常由垂体后叶肿瘤分泌过多激素造成。

adaptive immune response：适应性免疫反应，细胞对特异性抗原产生的应答过程。

adduct：内收，DNA 分子的一部分与另一部分产生共价结合造成的异常分子结构。

adenocarcinoma：腺癌，上皮细胞衍生形成的肿瘤。

adenoma（adj.，-omatous）：腺瘤，上皮组织中非侵袭性生长的恶性增生，大部分具有潜在的癌转化能力。

adherens junctions：黏附连接，一种细胞与细胞的连接方式，见于上皮细胞，主要通过肌动蛋白的相互作用完成。

adipocytes：脂肪细胞，一类特殊的间质细胞，与纤维细胞有一定联系，能产生并贮存脂肪，是脂肪组织中主要的细胞类型。

adipogenic：脂肪形成，分化形成脂肪细胞的过程。

adjuvant：佐剂，（1）一种高效的，刺激机体产生免疫应答的物质；（2）在治疗中提高药物功效的一类物质。

adoptive transfer：过继性转移，将供者的免疫细胞输给受者，以帮助免疫系统功能缺陷的受者产生免疫应答。

adrenal：肾上腺，位于肾脏上方的一个具有分泌作用的腺体。

afferent：输入的，指输入信号。

agonist：促效剂，具有活化能力的试剂。与之相反的是拮抗剂。

alkylating：烷化，将烷基或与烷基具有相似结构的化学基团结合到底物上，如 DNA 碱基。

allele：等位基因。一个基因的两个或多个替换型中的一种。

allogeneic：同种的。（1）指同一种属两个具有不同遗传背景的成员；（2）描述来自两个不同遗传背景的两组细胞或组织之间的联系。

allograft：同种异体移植物，同一种属内不同个体之间的移植物。

allograft rejection：同种异体移植物排斥反应，由于供者和受者的遗传背景不同，尽管属于同一种属之间的移植，但是在移植过程中，受者的免疫系统对供者的移植物产生免疫的应答。

alternative splicing：选择剪切，mRNA 成熟过程中有多种剪切方式，使得 mRNA 分子产生多种不同结合方式的外显子。

***Alu* repeat**：Alu 重复片段，人类基因组中一类大小约为 300bp，拷贝数在 500 000～1 000 000 的散在重复序列。

alveolus（pl.，alveoli）：小泡，组织中的一些小囊泡，见于肺组织、乳房组织、腺体。

amphipathic：兼性的，描述一类既包括亲水结构域，又包括疏水结构域的分子。

amplicon：扩增子，指一段明确的伸长的 DNA 片段。

amplification：扩增，拷贝数量的增加。

anaphase：后期，有丝分裂的第三个时期，此期细胞内的染色体分离并移向两极。

anaplastic：退行发育的，组织，细胞缺乏具有分化特性的起源。

anastomosis：连接现象，两个导管结构末端与末端相互连接，如动脉和静脉之间的相互连接。

anchorage dependence：贴壁依赖性，指细胞需要附着在固体基质上而生长的情况。

anchorage independence：贴壁非依赖性（贴壁独立性），指细胞不需要附着在固体基质上而进行增殖的能力。

aneuploidy：非整倍体，指携有结构异常的染色体的染色体组型 。

angiogenesis：血管生成，新的血管形成的过程。在某些情况下也称为新生血管形成。

angiogenic factor：血管生成因子，一种专门诱导血管生成的生长因子。

angiogenic switch：血管生成转换，指肿瘤细胞群从不能诱导血管生成到可以诱导血管生成的转换。

angiosarcoma：血管肉瘤，血管内皮细胞发生的恶性肿瘤。

anoikis：失巢凋亡，凋亡的一种，指细胞不能附着在固体基质上而发生凋亡。

anoxia：氧缺乏，指氧气缺乏的状态或环境。

antibody：抗体，由免疫系统浆细胞产生的可溶性蛋白，能高特异性的识别和结合特定抗原，也称免疫球蛋白。

antigen：抗原，一种分子或分子片段，常为一种寡肽，可以特异识别和结合抗体或 T 细胞受体或引起抗体的产生。

antigen-presenting cell：抗原呈递细胞，包括树突状细胞、巨噬细胞和 B 细胞，可以通过 MHCII 类分子将寡肽抗原呈递给其他免疫细胞特别是辅助性 T 细胞和细胞毒 T 细胞。

antiserum：抗血清，将动物暴露于特异性抗原产生的血清，它能识别和结合抗原。

apatite：磷灰石，骨的无机成分，由磷酸钙晶体组成。

apoptosis：凋亡。

apoptosome：一种多蛋白复合物，包含细胞色素 c 分子和 Apaf-1，通过使酶原活化为酶帮助启动。

apposed：并列或相邻。

apurinic：无嘌呤。

apyrimidinic：脱嘧啶产物。

aromatic：芳香族化合物，含有一个或多个苯环的有机分子。

arteriole：微动脉，流向毛细血管的小动脉。

ascites：腹水，在某些癌症患者腹腔积聚的液体，其中常含有恶性肿瘤细胞。

astrocytoma：星形细胞瘤，脑的一种支持细胞（非神经细胞）的肿瘤。

asynchronous：非同步细胞，指散布于细胞周期各个时间点的一群细胞，这些细胞不以协调或同步的方式执行特异的细胞周期步骤。

ataxia：共济失调，肌肉协调性丧失，常由小脑功能障碍引起。

atrophy：萎缩，组织的缩小 ，常常因为组织细胞生长发育能力下降或正常细胞数目减少所致。

autochthonous：（1）本地的；（2）指机体自生的肿瘤（而非种植细胞或由肿瘤片段引起）

autocrine：自分泌，指由细胞释放激素或因子再反过来作用于释放激素或因子的细胞的现象。

autoimmune：自身免疫（病），免疫系统攻击自身正常组织或细胞的过程或疾病。

autologous：自体同源材料，指来源于患者自身的可以通过体外操作再回输给患者的生物材料，如细胞或组织。

autophagy：自噬，指因营养缺乏或激素作用，细胞将自己细胞质的一部分（如线粒体和内质网）包围起来形成液泡，再依靠初级溶酶体供应的水解酶将其消化。

autophosphorylation：自我磷酸化，蛋白质的有自身相关激酶引起的磷酸化。

autoradiography：放射自显影，利用放射性样品在感光底片上成像检查样品中放射性元素及其分布的一种同位素示踪技术。

autosome：常染色体，即非性染色体（ 非 X 染色体或 Y 染色体）。

axillary：腋窝。

Barr body：Barr 小体，在雌性有胎盘哺乳动物所有细胞均可见的浓缩非活化的 X 染色体。

Barrett's esophagus：巴雷特食管，食管的鳞状上皮细胞化生为正常情况下在胃出现的分泌上皮细胞。

basal：（1）指物理上处于底层的（基底的）。（2）基础的，指没有其他刺激下的安静状态的较低的代谢率。

basal lamina：基底膜，一层特殊的细胞外基质，分离上皮细胞和间质细胞，或者内皮细胞和周细胞。

base-excision repair：碱基切除修复，由一种修复酶切除错配碱基的糖苷键，留下一个不带碱基的核苷酸，再由其他酶切除脱氧核糖-5-磷酸并重新加上正确碱基的修复方式。

basement membrane：基底膜，一层特殊的细胞外基质，分离上皮细胞和间质细胞，或者内皮细胞和周细胞。

benign：良性，（1）用于形容一个局限于特定组织的新生物，没有侵犯周围组织的迹象。（2）没有突破基底膜的上皮组织肿瘤。

bioinformatics：生物信息学，用计算机的方法来处理和分析生物信息，特别是复杂的生

物信息集合的科学。

bi-specific：双特异性，同时特异的识别两种物质的能力。

bisphosphonates：二磷酸盐，具有 P-C-P 结构的一类化学物质，被整合成骨磷灰石，最后可对成骨细胞造成毒性并最终导致溶骨。

blast：通常作为前缀或者后缀，暗示相对未分化或者胚胎前体细胞。

blastocoel：胚泡腔，胚泡的空腔。

blastocyst：胚泡，脊椎动物胚胎发育早期，整个胚胎主要由外细胞层包裹一个空腔。

bleb：疱，小的凸出膜结构的泡状物，如质膜。

body-mass index：体重指数，体重除以身高的平方，w/h^2。

breakpoint：断裂点，染色体或者基因上的某个位点，可以通过这个位点与其他染色体或者基因发生融合。

bronchial：支气管的，与肺中的主要气道有关的。

buccal：口腔的、颊的，与空腔有关的，特别是与颊上的上皮有关的。

by-pass polymerase：旁路聚合酶，一种 DNA 聚合酶，此酶可以在未修复的 DNA 损伤区以“猜测”的方式来合成新的互补单链，防止不恰当的融合和突变。

cachexia：恶病质，通常见于恶性肿瘤晚期，患者食欲低下并有全身多组织的衰竭。

café au lait spot：咖啡牛奶斑，皮肤上的棕色斑，通常见于 1 型神经纤维瘤综合征。

capsid：衣壳，是病毒微粒外部的蛋白质衣壳。

carcinogen：致癌物，能够导致癌症的化学物质。

carcinogenic：致癌性，引发癌症的能力。

carcinoma（adj.，-omatous）：肉瘤，上皮组织来源的恶性肿瘤。

caretaker：看护基因，编码蛋白质具有维持基因组稳定性，防止恶变细胞形成的基因。

caspase：一个蛋白质酶家族，其成员在凋亡（细胞程序性死亡）中起作用。

CD4：辅助 T 细胞表面的一种蛋白，帮助它们识别专职的抗原呈递细胞表面的 MHC II 类分子。

CD8：细胞毒性 T 细胞表面的一种蛋白，帮助识别 MHC I 类分子。

CD20：很多类型的 B 细胞表达的分化抗原。

cell-autonomous：细胞自主的，指由细胞基因组或内在生理所决定的细胞特征或行为，与细胞与其他细胞的相互作用无关。

cell cycle：细胞周期，从一次细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束的过程。

cell cycle clock：细胞周期时钟，在细胞核中由信号蛋白组成的网络，用于精确的调控细胞周期进程。

cell line：细胞系，能够在体外培养无限制的传代的细胞。

cellular immune response：细胞免疫应答，特定细胞参与的免疫应答，包括细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞等，识别并清除异常细胞和入侵的病原体。

centriole：中心粒，在减数分裂期聚集在中轴附近、由微管组成的小空圆柱体，位于着丝粒上。

centromere：着丝粒，染色体聚集区域，包含减数分裂或有丝分裂纺锤体结合位点。

centrosome：中心体，细胞中的一种由一个中心粒和附属蛋白组成的小体，一个中心体组织纺锤体的一半。

checkpoint：检验点，是细胞周期的控制机制，用于确保细胞必须达到一系列前提条件后才能进入细胞周期的下一个步骤，这些前提条件包括完成了之前的所有步骤。

chemokine：趋化因子，一种化学信号，通常是多肽，能够吸引运动细胞，如白细胞。

chemotaxis（**adj.**，**-tactic**）：趋化性，细胞朝着高浓度趋化因子定向游走的特性。

chimera：嵌合体，来源于不同基因型的亲代或不同细胞和组织构成的生物体。

chimerization：嵌合，是一种将供体细胞导入到宿主囊胚的过程，细胞可以插入到囊胚当中，随后参与某些组织发生的形成过程。

chimerized：嵌合的，（1）一个重新设计的基因产生的蛋白，两个有显著差异的物种组成了这个蛋白质的两个部分。（2）一个抗体分子的 C 端的氨基酸序列被其他物种的同源序列所取代。如人的 C 端区域取代老鼠的 C 区。

chromatid：染色单体，存在于 M 期之前和 S 期之后的半个染色体，成对的染色单体在 M 期被分开，随后转变成了染色体。

chromatin：染色质，构成染色体的 DNA、RNA 和蛋白质的复合物。

class switching：类别转换，基因重排发生在已经形成抗原结合可变区序列的免疫球蛋白基因中，从结合的一个恒定区转变成另一个恒定区，导致了抗体分子的恒定区在免疫球蛋白的 mRNA 水平编码的改变。

clone（**adj.**，**clonal**）：克隆，（1）是由重组 DNA 技术分离的基因拷贝，能够扩增出大量的相同片段。（2）所有的细胞都来源于共同的祖细胞。（3）是无性生殖再造过程的产物，一个组织的体细胞的基因组可以形成一个功能同等于受精卵的细胞，它本身有可能发育成另一种器官。

co-carcinogen：致癌物，一种试剂或者物质，本身并没有致癌作用，但能加剧其他促癌剂的促癌作用。

colonization：集群，微转移细胞的扩增导致了肉眼可见的转移的形成。

colony：集落，（1）一般用于原始克隆的细胞群。（2）可以不在固相支持物就可以扩增的细胞群。

colorectal：结肠直肠的，涉及包括结肠和直肠的低位胃肠道。

compartment：区室，是包含一个组织内所有特定类型的细胞的身体上或者实际的区域。如干细胞的区室。

complement：补体，是一组能与细胞表面的抗原结合的抗体分子相互作用的血浆蛋白质，包括那些细菌、酵母菌或者哺乳动物的细胞；一旦通过这些抗体分子结合到细胞表面，补体就会通过在周围的细胞膜上打孔而杀死这些细胞。

complementation：互补，两个变异的基因表型共存于同一细胞或器官当中，能够互相弥补各自的缺陷，从而产生一个野生型的基因表型的能力。表明这两个基因表型在不同的基因上有变化。

complete carcinogen：完全致癌物，一种具有既能引发又能促发肿瘤生长的物质。

complete response：完全反应，在抗肿瘤治疗之后所有可查的肿瘤团块的消失。

confluence：会合，单层培养扩增的细胞直到充满培养皿的底部的可用空间而达到的

状态。

congenital：先天性的，在出生时就存在的一种状态，有可能终身存在。

constitutive：组成性的，在固定水平上的一种活性状态，不会受生理规律的调节，或者是产生持续输出的控制类型。

contact inhibition：接触抑制，在单层培养皿上繁殖的细胞直到相互接触之后才停止生长的一种特性。

contralateral：对侧的，相反的一侧。

copy choice：选择性复制，一个正在复制的DNA链如何从多种互补的DNA链中选择模板继续延长的一种分子生物学机制。

counterstain：复染剂，在显微镜下，通过对其他实体组织进行不同染料或其他物质的染色，在这些组织的背景之下突出感兴趣的实体组织的是组织学过程。

crisis：危象，当细胞的端粒没有足够的长度时，导致了染色体衔接处的融合，核型的混乱和大量的细胞凋亡的一种危急状态。

cross-immunity：交叉免疫，最初是由特定的抗原和感染因素引起的免疫反应，随后发现额可以由不同的抗原和感染因素引起。

crypt：隐窝，是小肠或者大肠壁上的深穴，有肠干细胞的增生和原始分化的发生。

cyclin：细胞周期调节蛋白，是一种与周期素依赖性蛋白激酶作用的蛋白质，是这种酶的调节催化亚单位，它可以激活其催化活性并且引导它可以与合适的底物相结合。

cyclin-dependent kinase：周期素依赖性蛋白激酶，是一类存在于细胞周期机制中的丝/苏氨酸蛋白激酶，依赖于与细胞周期调节蛋白的结合方能发挥功能。

cycloheximide：放线菌酮，一种能够阻碍核糖体在mRNA模板上的下移，从而阻断蛋白质的合成的药物。

cyclopia：独眼，胚胎头部的发育畸形，仅有一只位于头部中央的眼睛。

-cyte：细胞类型的后缀。

cytoarchitecture：细胞构筑，细胞的物理结构。

cytocidal：细胞自杀，引起细胞死亡的影响因素。

cytokeratin：细胞角蛋白，构成细胞骨架的角蛋白，区别于毛发和指甲中的角蛋白。

cytokines：细胞因子，(1) 刺激一个或多个细胞促进造血系统造血的生长因子；(2) 免疫系统的调节因子。

cytokinesis：胞质分裂，M期最后一步，此期细胞一分为二形成两个子细胞。

cytology (adj.，-logical)：细胞学，(1) 显微镜下分析亚细胞结构；(2) 细胞的显微结构。

cytopathic：细胞病变，导致细胞的损伤和死亡。

cytoskeleton：细胞骨架，真核细胞中的蛋白纤维网架结构体系。

cytosol：胞质溶胶，细胞质中的液态成分。

cytostatic：细胞生长抑制，抑制细胞的增殖但是不影响其生长。

de novo：从头，(1) 从新开始；(2) 初次发生。

***de novo* methylase**：从头甲基化，向DNA分子一个新的位置添加甲基基团。

deamination：脱氨作用，从大分子中去除氨基。

decatenation：将 DNA 双螺旋分离。

dedifferentiation：去分化，将分化细胞转为低分化细胞的过程。

degranulation：脱粒，用生理学方法将细胞质内的颗粒排除到细胞外基质。

delayed early：延迟早期，基因的表达依赖于新生蛋白复合物，其表达在生长因子刺激之后延迟。

demineralize：去除矿物质。

denaturation：变性，导致某一分子（如 DNA、RNA、蛋白质）失去原有的三维结构。

dendritic cell：树突状细胞，一类具有抗原呈递功能的免疫细胞。

dendrogram：分支图，将本质紧密联系的图表，形如树枝状，基因、细胞等数据位于分支上并相互联系。

density inhibition：细胞过密性抑制，见“contact inhibition”。

denuding：剥脱，将组织或细胞剥离。

depurination：脱嘌呤，脱除 DNA 或 RNA 中脱氧核糖和核糖里的嘌呤碱基。

depyrimidination：脱嘧啶，脱除 DNA 或 RNA 中脱氧核糖和核糖里的嘧啶碱基。

dermal：皮的，薄的间质细胞构成的位于表皮角化细胞下的一层富含成纤维细胞的皮层。

dermis：真皮，皮肤的间质层，富含大量成纤维细胞。

desmoplastic：促结缔组织增生的，肿瘤或某些慢性炎性组织中结缔组织形成的坚硬的胶原基质增生。

detoxify：解毒，将有毒物质清除。

diagnostic bias：诊断性偏倚，指诊断技术对结论的影响，而不能精确地反映疾病的本质。

diapedesis：血细胞渗出，血细胞向血管外周围组织渗出的过程。

dicentric：双着丝粒的，一个染色体或染色单体具有两个着丝粒。

differentiation：分化，一个细胞获得特定性状的过程，如特定组织中细胞获得特定的生物性状。

dimer：二聚体，由两个亚单位构成的分子复合物。

diploid：二倍体，每条染色体都有成对的两个拷贝的细胞核。

disseminated：播散的，向周围播散。

dominant：显性的，(1) 指一个或多个选择的性状对应一个基因座，当基因座为杂合子时，显性的性状将会被抑制；(2) 描述一个等位基因决定一个性状，无论其他等位基因表达何种性状。

dominant-interfering，见“dominant-negative”。

dominant-negative：显性负相，指突变型等位基因与野生型等位基因共表达时，可能干扰野生型等位基因的功能。

double minute：双微体，一段染色体片段与染色体分离，作为不与着丝粒相连的染色体外粒子。

druggable：一种分子，如蛋白质，它的结构和功能决定它能和一些小分子质量复合物结

合并被其扰乱生物功能。

dysplasia（adj.，-plastic）：发育异常，由癌前病变组织形成的非正常组织。

ectoderm：外胚层，胚胎早期最外层的细胞。

ectodomain：外功能区，细胞表面蛋白的某一区域，从质膜伸出到细胞外基质。

ectopic：异位的，(1) 在某一非正常条件下表达；(2) 指某一细胞或组织在正常机体内不能发现。

effector：效应器，受调节并产生相应应答的一类靶物质（如蛋白质）。

effector loop：效应环，Ras 蛋白的某一区域，直接参与蛋白之间的相互作用，能引起效应蛋白功能活化。

efferent：输出信号，向外输出的信号。

efficacy：效力，通过某些试剂引发特异性的临床应答的能力。

electrophilic：亲电子的，指一些分子具有搜寻和应答某些电子底物的能力。

embolization：血栓形成，血栓形成的过程。

embolus：栓子，血管中血液形成的凝血块或其他物质形成的阻塞物。

-emia：血症，血中出现某种类型细胞或物质时使用的后缀。

encapsidation：壳体化，将病毒基因组包裹入壳体的过程。

endocrine：内分泌，由内分泌细胞分泌信号分子到血液中，通过血液循环运送到体内某个部位，作用于靶细胞。

endocytosis：胞吞作用，通过细胞膜内陷形成囊泡，将外源性物质运输到细胞内的过程。

endoderm：内胚层，胚胎早期最内层的细胞。

endogamy：同系交配，同一物种内的交配。

endogenous：内源性，起源于细胞、组织、器官内。

endogenous provirus：内源性前病毒，通过某一物种传播的反转录病毒前体。

endometrium：子宫内膜，子宫壁内侧的膜结构。

endoplasmic reticulum：内质网，是真核细胞重要的细胞器，由封闭的膜系统及其围成的腔形成相互沟通的网状结构。

endoreduplication：核内复制。

endosome：胞内体，是动物细胞内由膜包围的细胞器，起作用是传输由保吞作用摄入的物质到溶酶体被降解。

endothelial cell：内皮细胞，(1) 毛细血管和淋巴管内侧的间充质细胞；(2) 大血管和淋巴管内侧的间充质细胞。

enhancer：增强子，一类位于基因附近或基因内部的短序列，在转录过程中能与转录因子结合，从而影响基因的转录。

enterocyte：肠上皮细胞。

eosinophil：嗜曙红细胞，一种具有自动吞噬能力的粒细胞，它可以从血中转移至组织间隙，表达表面 IgE 受体，并能通过各种机制清除寄生物。

epidermis（adj.，-dermal）：表皮，皮肤的表皮层。

epigenetic：表观遗传，一种不依赖 DNA 核酸序列的修饰而产生的变化。

epithelial-mesenchymal transition：上皮-间质转变，上皮细胞表型向间质细胞表型转变的过程，如纤维化。

epithelium：上皮。

epitope：表位，一种能被抗体分子识别并结合的特殊化学结构。

erythroblastosis：有核红细胞增多症，一种恶性前体红细胞。

erythrocyte：红细胞。

erythroleukemia：红白血病，一种以无色素前体红细胞增多为特征的白血病。

erythropoiesis：红细胞生成，红细胞的形成过程。

erythropoietin：促红细胞生成素，能刺激产生红细胞的一类生长因子。通常在缺养状态下产生。

etiology（adj.，-ologic）：病因学，（1）研究疾病发病机制的学科；（2）研究导致某一特定的病理状态机制的学科 。

euchromatin：常染色质，指间期细胞核内染色质纤维折叠压缩程度低，处于伸展状态，用碱性染料染色是着色浅的一类染色质。含有能转录的活化基因。

eukaryotic：真核的，真核生物的，指多细胞动物、有胚植物和许多原生动物具有的大的，复杂的，有核的细胞。

euploid：整倍体，（1）指数目正确，结构正常的一类染色体集合（通常是二倍体）；（2）描述一组具有互补染色体的核型。

event-free survival：在没有其他记录的临床疾病发病时早期的处理阶段。

ex vivo：在体外，发生在活体之外。

exocrine：外分泌，指腺体通过导管向胃肠道或皮肤外分泌液体的一种分泌途径。

exocyclic：环外的，产生与某一分子环外的化学组分。

exocytosis：胞吐作用，将细胞内的分泌泡或其他某些膜泡中的物质通过细胞质膜运出细胞的过程。

exogenous：外源性的，起源于细胞、组织、器官之外。

exon：外显子，不连续序列中的编码基因，在剪切过程中保留。

expression：表达，（1）活化的基因转录，翻译形成蛋白质的过程；（2）通过细胞间相互作用向间质释放液态物质的过程。

expression program：表达程序，基因相互协调表达的过程。

expression signature：表达标记，指上调基因和下调基因与某一特定性状具有相互联系。

extracellular matrix：细胞外基质，分步与细胞外空间，由细胞分泌的蛋白和多糖所构成的网络结构。

extravasation：溢出物，由血管或淋巴管向管外溢出到周围组织的物质。

familial：家族性的，指某一形状或综合征在某一家系里具有遗传特征。

fibrin：纤维蛋白，卵裂时，由血浆纤维蛋白原形成的蛋白质，它们能与血小板结合而导致血液凝集。

fibrinogen：纤维蛋白素原，见“fibrin”。

fibrinolysis：纤维蛋白溶解作用，使用蛋白酶溶解纤维的过程。
fibroblast：成纤维细胞，构成纤维性结缔组织的重要成分。
fibrocyte：纤维细胞，骨髓起源的一类为分化细胞，表达胶原。体外培养时紧密结合在一起。在组织中主要提供成纤维细胞前体和（或）肌成纤维细胞。
fibrosis：纤维变性，纤维组织取代正常上皮组织的过程。
field cancerization：区域性癌变，组织、器官某一区域癌前病变或新生物生长的过程。
filopodium：线状伪足，细胞表面的一种特化结构。
focus（**pl.**，**foci**）：焦点，单层或普通细胞中的一组转化细胞簇。
functional genomics：功能基因组学，（1）通过测定基因的表达是水平而分析细胞表型的技术；（2）分析、比较不同细胞表型的一种技术。
fusogenic：融合，使两个生物膜发生融合的能力，如两个相邻细胞质膜的融合。

gametogenesis：配子形成，即配子产生的过程。
gastric：胃的，同“stomach”。
gastrulation：原肠胚形成，胚胎发生早期的一种状态。
gatekeeper：看门基因，一类保护新生细胞，阻止细胞增殖、分化、死亡的基因。
gene amplification：基因扩增，增加二倍体基因的拷贝数量。
gene family：基因家族，祖先基因在进化过程中向下传递的一组基因称为基因家族。基因家族中的基因编码结构相关的不同蛋白质。
gene pool：基因库，所有生物基因组中基因的集合。
genetic background：遗传背景，基因组中所有等位基因的排列。
genetic polymorphism：遗传多态性，指生物体基因组中一段对表型无影响的变异序列，作为孟德尔决定子传递遗传信息。
genomic clone：基因克隆，将基因组的基因拷贝成多个特异性片段的过程。
genotoxic：遗传毒性，一种具有损伤基因组能力的试剂。
genotype：基因型，（1）一个生物体的基因结构；（2）一个生物体的基因性状。
germ line：种系，（1）是一个生物体向下一代传递的基因的集合；（2）多细胞生物向下一代传递基因的细胞集合。
glioblastoma：神经胶质瘤，同“glioma”。
glioma：神经胶质瘤，神经胶质细胞形成的肿瘤。
glycoprotein：糖蛋白，被糖基化修饰的一类蛋白质。
glycosaminoglycan：葡萄糖胺聚糖。
glycosylase：糖基化酶，作为碱基切除和错配修复系统中的一部分，切除核苷酸中碱基和糖组分间的β-*N*-糖苷键的酶。
glycosylation：糖基化，多肽链中连上糖基。
granulocyte：粒细胞，白细胞的一类。
gray（**Gy**）：戈瑞（吸收剂量单位），辐射吸收剂量单位。
growth factor：生长因子，一种能够刺激细胞生长和（或）通过结合某种特殊的细胞表面受体而使细胞增殖的蛋白。

half-life：半衰期。

hamartoma：错构瘤。

haploid：单倍体，每个染色体只有一个拷贝的细胞核。

haploinsufficiency：单倍剂量不足。

hemangioblastoma：成血管细胞瘤，具有形成血管能力的一类内皮细胞前体肿瘤。

hematogenous：血细胞生成，依赖于循环血液或者被循环血液所促进。

hematopoiesis（adj.，-poietic）：血细胞生成，红细胞、白细胞以及各种血细胞的形成过程。

hemidesmosome：半桥粒，是一种位于上皮细胞表面的整联蛋白分子簇，将细胞锚定于基底膜上。

hemi-methylated：半甲基化，指 DNA 双链中只有一条链被甲基化修饰。

hemizygosity：半合子，每个细胞只含有一个拷贝的常染色体基因。

heparin：肝磷脂，一种细胞外基质氨基葡聚糖。

hepatocellular carcinoma：肝细胞癌，原发于肝细胞的肿瘤。

hepatocyte：肝细胞。

hepatoma：肝癌，同肝细胞癌。

herceptin：癌基因蛋白单克隆抗体，一种抗肿瘤的单克隆抗体。

heterochromatin：异染色质，结构致密的染色质，位于其中的基因不能转录。

heterodimer：异源二聚体，由两个不同的亚单位构成的分子复合物。

heterokaryon：异核体，具有两个遗传特性不同的细胞核的细胞。

heterotrimer：异质三联体，三个不同的亚基构成的分子，如三条不同的蛋白链。

heterotypic：异型的，指两个或多个不同类型的细胞之间的相互作用和相互影响。

heterozygous：杂合的，指某一基因位点上的两个等位基因来源于不同的基因。

high-grade：高废的，肿瘤在多步复杂的形成过程中逐渐具备高度恶性的过程。

histo-：组织，同“tissue”。

histocompatibility：组织相容性，组织、细胞耐受宿主免疫应答反应而存活的能力。

histocompatibility antigen：组织相容性抗原，一种细胞表面蛋白，决定移植细胞或移植组织是否耐受宿主免疫应答反应。

histology：组织学，见“histopathology”。

histopathology：组织病理学，在显微水平研究组织结构的一门学科。

holoenzyme：全酶，由酶蛋白和辅基或辅因子构成的结合酶，以区别单纯由氨基酸组成的单纯酶。

homodimer：同二聚体，两种同类型分子构成的聚合物。

homogeneously staining region：同源染色区。

homolog：同系物，具有共同祖先的一类基因。

homophilic：嗜同种的，指某一分子通常与同类型的分子相结合的特性。

homopolymer：同聚物，由单一类型的分子构成的聚合物。

homotetramer：同源四聚体，四种来源相同的分子构成的聚合物。

homotypic：同种型，（1）两种同类细胞之间的相互影响和相互联系。（2）两种相同类

型分子之间的相互影响和相互联系。

homozygous：纯合的，某一基因位点的两个基因拷贝来源于同一等位基因。

housekeeping gene：持家基因，某些基因产物在整个生命过程都是需要的或必不可少的，它们的编码基因在一个物种或一个生物个体的几乎所有细胞中都持续表达。

humanize：人源化，使得某种抗体具有人类特性。

humanized antibody：人源化抗体，指一种抗体分子，它的 C 区和 V 区氨基酸序列在抗原结合部之外，并且被人类同源序列所取代，使得其抗原结合序列稳定。

humoral：体液的，一种溶解状态的物质。

humoral immune response：体液免疫应答，由抗体介导的免疫应答。

hydrocarbon：碳氢化合物，一种有碳原子和氢原子组成的化合物。

hydrophilic：亲水的，一种易于与水接触的环境。

hydrophobic：疏水的，一种避免直接与水接触的环境。

hypercalcemia：高钙血症，血中钙离子含量高于正常水平。

hyperinsulinemia：高胰岛素血症，血中胰岛素水平高于正常。

hyperoxia：氧过多，高氧张力的状态。

hyperphosphorylated：高度磷酸化的，蛋白质磷酸化程度增加。

hyperplasia（**adj.**，**-plastic**）：增生，组织中出现大量正常细胞的聚集。

hypophosphorylated：低磷酸化的。

hypoxia：缺氧，低氧张力的状态。

idiotype：独特型，指一种抗原的结构是由抗体氨基酸序列形成的抗原结合“口袋”决定的。

immediate early：超急性期，指一组基因的表达是通过生长因子刺激快速产生的，即使蛋白合成受到抑制。

immortality：不死性。

immortalization：永生。

immunocompetent：免疫活性的，具有完整的功能性免疫系统。

immunocompromised：免疫妥协，缺乏完整的功能性免疫系统。

immunocyte：免疫细胞，具有免疫系统某一功能域的一类细胞。

immunodeficient：免疫缺陷的，见“immunocompromised”。

immunoediting：免疫编辑，免疫系统允许免疫原性弱的肿瘤细胞存活，而清除免疫原性强的肿瘤细胞的过程。

immunoevasion：免疫逃避，非正常细胞或感染因子逃避机体免疫应答而存活的过程。

immunofluorescence：免疫荧光，使用直接或间接与荧光染料结合的抗体，将组织切片染色，从而显示抗原与抗体特异性结合的一种方法。

immunogen（**adj.**，**-genic**）：免疫原，一种能引起机体特异性免疫应答的化学物质。能被抗体分子识别并结合。

immunoglobulin：免疫球蛋白，指具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白。

immunohistochemistry：免疫组织化学，通过抗原抗体反应，在电镜下观察，检测抗原

的一种方法。

immunoprecipitation：免疫沉淀作用，通过使用一种能特异性识别和结合某种分子的抗体，使该种分子沉淀的过程。

immunoproteasome：免疫蛋白酶体，一种蛋白酶体，常见于专职抗原呈递细胞，能特异性产生一种肽类物质供细胞表面的 MHC 分子识别。

immunostaining：免疫染色，使用抗体对组织切片中特异性的细胞或亚细胞结构进行染色。

immunosurveillance：免疫监视，机体免疫系统不停地对组织内紊乱细胞，包括肿瘤细胞监控的过程。

immunotoxin：免疫毒素，一类针对特定组织和细胞的毒素，可以与特定的抗体结合，通常是单克隆抗体。

in situ：原位，（1）产生于起始部位。（2）肿瘤细胞未突破基底膜。

in utero：在子宫内，产生于胚胎或胎儿期的子宫内。

in vitro：在体外，产生于活体外。

in vivo：在体内，（1）产生于活的器官内。（2）产生于活的完整的细胞内。

inbreeding：近亲婚配。

incidence：发病率，某种疾病在人群中发生的比例。

indication：适应证。

initiation：起始作用，肿瘤发生过程第一步。

initiator：起始物，触发肿瘤发生过程第一步的物质。

innate immune response：天然免疫应答，又称为固有免疫应答，指抗原性物质初次刺激机体而产生的免疫应答。

inoculum：接种物，用于接种的物质。

insertional mutagenesis：插入诱变，将一段 DNA 片段插入或整合至染色体 DNA 而促使其发生突变的过程。

integration：整合，将外源性 DNA 片段插入染色体 DNA 的过程。

integrin：整联蛋白，一种能结合细胞外基质组分和胞内转导信号的细胞表面受体。也能与细胞骨架成分结合，促进细胞外基质与细胞骨架的结合。

interleukin：白细胞介素，一种能刺激机体免疫系统产生各种细胞成分的生长和分化因子。

intermediary metabolism：中间代谢，细胞内发生的各种生物大分子相互转化的复杂的生物化学反应。

internalization：内化，蛋白质或其他生物大分子吸收入体内或细胞内的过程。

interphase：分裂间期，细胞从上一次分裂结束到下一次分裂开始之间的时期。

interstitial：间质的，细胞与细胞之间的组织。

interstitial deletion：中间缺失，染色体中段发生的缺失，对染色体末端结构无影响。

intraepithelial：上皮内的，（1）上皮内的病理改变。（2）上皮内基底膜下瘤的形成。

intravasation：内渗，从周围组织侵入血管或淋巴管的过程。

intra-vital：活体的，发生于活体组织内的某种过程。

intron：内含子，不成熟 mRNA 通过剪切形成成熟 mRNA 过程中所剪切掉的一段序列。

invasion：侵袭，（1）肿瘤细胞或肿瘤组织从原发部位向邻近正常组织转移的过程。（2）癌细胞突破基底膜的过程。

involution：内转。

isoform：对碘氧基苯甲醚，结构和功能与其他蛋白相似的一类蛋白质。

junk DNA：无功能 DNA，无任何生物学功能基因组 DNA。

juxtamembrane：近膜，定位于膜附近。

Kaplan-Meier plot：卡普兰-迈耶曲线，一种观察临床生存率的图表。

karyotype：核型，染色体组在有丝分裂中期的表型，包括染色体数目、大小、形态特征等。

keratinocyte：角质化细胞，上皮细胞的一种类型。

keratosis：角化病，一种发生于皮下的与角质细胞相关的良性病变。通常由于长期暴露于放射线引起。

kinase：激酶，一种能将磷酸基转移至底物的酶类，通常是一种蛋白质。

kinetochore，动粒：细胞有丝分裂或减数分裂中期，连接着丝粒微管和染色体在着丝粒上的 DNA 并提供动力的盘状核蛋白复合体。

kinome：激酶组，由基因组，如人类基因组等，编码并表达的所有激酶的组分。

labile：不稳定的，很容易发生改变：包括改造和破坏。

lamellipodium：薄片状伪足，多见于能动细胞的前缘部分，形成含胞质与胞膜向胞外延伸的宽且薄的皱边体。

laser capture microdissection：激光捕获显微切割，通过显微镜，用激光束分离并获取来自同一包埋组织切片上的各种不同细胞。

leiomyoma：平滑肌瘤，多见于子宫，瘤组织由形态较为一致的梭形平滑肌细胞（间质细胞）构成。

leukemia：白血病，造血细胞质与量的恶性改变；多累及淋巴和粒细胞的相关谱系，在此情况下，肿瘤细胞含非色素颗粒并扩散于周身。

leukemogenesis（**adj.**，**-genic**）：白血病生成，白血病生成的过程。

leukocyte：白细胞，特指含非色素颗粒的造血细胞，如淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞。

leukosis：造白细胞组织增生，鸡的一种类白血病样的疾病。

library：库，（1）生物基因组的所有基因克隆产物的集合，这些克隆的基因均是基因组的不同组分。（2）其他 DNA 克隆的集合。如 cDNA 文库，以组织细胞中的mRNA为模板，反转录合成双链 cDNA，各 cDNA 分子分别插入载体形成重组子，再导入宿主细胞克隆扩增。这些在重组体内的 cDNA 的集合即 cDNA 文库。

ligand：配体，与受体的特异结合并激发相关信号通路。

ligase：连接酶，催化单链 DNA 或 RNA 的 5′端磷酸与单链 DNA 或 RNA 的 3′端羟基共价连接。

lineage：谱系，由祖细胞发展形成众多子代细胞共同组成的线性演变过程。

locus：基因座，用来推测和研究与特异基因相关的染色体位点。

low-grade：低度的，肿瘤有很低的演进能力，但仍相对良性。

lumen（pl.，lumina）：腔，中空、管腔样结构，如肠道、肺的支气管，血管和分泌器官的导管部分等。

luminal：腔的，形成条索或管腔样结构的细胞。

lymph：淋巴，细胞间的组织液部分进入淋巴结。然后进入较大的淋巴管，最后排入锁骨下静脉的循环系统。

lymphangiogenesis：淋巴管生成，形成新的淋巴管的过程。

lymphocytes：淋巴细胞，来自白细胞的分类，其参与体液免疫和细胞免疫，它包括 B 细胞、T 细胞、NK 细胞及相关衍生细胞。

lymphoid：淋巴细胞的，淋巴样的：（1）专指淋巴系统；（2）造血细胞中能产生 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、NK 细胞等谱系。

lymphokine：淋巴素，能特异性引起和（或）激活淋巴细胞的细胞因子或生长因子。

lymphoma：淋巴瘤，淋巴细胞的实体瘤。

lysate：溶胞产物，溶菌产物，溶解组织或细胞而形成的产物，通常伴有组织或细胞内容物的释放。

lysosome：溶酶体，存在与胞质中脂囊泡结构，其 pH 很低，内有降解酶，专司溶解进入其内的各种分子。

lytic：溶解的，通常见于特定病毒对感受态宿主引起的细胞病变而导致组织或细胞的溶解。

lytic cycle：裂解循环，溶菌周期，病毒感染和复制的一种类型，最终引起宿主细胞的裂解。

macronucleus：大核，多见于含纤毛成分的细胞，其内含有多于两个以上的胞核，携带有多拷贝基因，并转录形成各种 mRNA 。

maintenance methylase：维持性甲基化酶，在 DNA 双链中，该酶带有甲基化成分标签非甲基化 CpG 岛并与已甲基化的 CpG 岛形成互补。

major histocompatibility antigen：主要组织相容抗原，为细胞表面蛋白的一种，形成寡肽类抗原，有免疫原性。

malignant：恶性的，为肿瘤恶化生长的证据，多表现为局部浸润和转移。

mammary：乳房的，特指产生乳汁的腺体或乳房。

mast cell：肥大细胞，骨髓来源的细胞，有 IgE 相关受体 Fc，在特定抗原刺激下，能参与 IgE 的介导，造成脱颗粒。

medical：医学的，医药的，医疗的，在疾病治疗中，对相关药物的使用而不是外科手术。

medulloblastoma：成神经管细胞瘤，在小脑中，形成肿瘤细胞的神经元前体。

megakaryocyte：巨核细胞，来自造血系统的细胞，能产生血小板。
melanin：黑色素，形成皮肤的色素，多由皮肤的黑色素细胞合成的黑色或棕色颗粒。
melanocyte：黑素细胞，神经嵴来源的，能在皮肤和虹膜等处形成色素颗粒的细胞。
melanoma：黑色素瘤，黑色素细胞来源的肿瘤，这些黑色素细胞存在于皮肤和虹膜中。
melanosome：色素（颗）粒，黑素体，黑色体，黑色素细胞胞浆中的黑色素颗粒小体，转移并传递到角化层细胞。
menarche：月经初潮，月经周期的开始时间。
mesenchymal：间充质细胞，间质的，（1）中胚层来源的相关组织细胞，如纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞和免疫细胞；（2）针对个体的属于同一分类的细胞。
mesenchymal-epithelial transition：间质-上皮变迁，上皮组织细胞向间质细胞变迁（与上皮-间质变迁比较）。
mesoderm：中胚层，早期胚胎发育过程中形成的中间胚层，介于外胚层和内胚层之间。
metabolite：代谢产物，通过酶的参与，使前体化学物质转化成其他化学物质。
metalloproteinase：金属蛋白酶，含有金属原子的蛋白酶，通常如锌，可作为催化位点。
metaphase：中期（细胞分裂），处于分裂期的第二阶段，此时核膜消失，染色质处于高度压缩状态，光镜可以观察到带型分布。
metaphyta：有胚植物，由多细胞组成的植物。
metaplasia：化生，一种分化成熟的细胞为另一种分化成熟的细胞所替代的过程。
metastasis：转移，恶性肿瘤细胞从原发部位侵入淋巴管、血管或体腔，不连续地迁往到他处而继续生长，形成与原发瘤同样类型的肿瘤的过程。
metazoa：后生动物，多细胞动物，由多细胞组成的生物。
micrometastasis：微（小）转移（灶），微小转移，由单个或小团细胞的转移，并可通过显微镜观察。
micronucleus：小核，微核，（1）小片段的胞核，也有自身核膜，多见于细胞分裂时的畸变或遭受打击形成；（2）存在于许多有纤毛成分的细胞，其含有较小的两个以上的细胞核，并携带和传递给子代细胞。
microsatellite：微卫星，由前后排列的二、三或四核苷酸重复单位顺序排列组成的简单序列长度多态性，也叫简单串联重复。
microthrombus：微栓子，见“embolus”。
mismatch repair：错配修复，在 DNA 修复过程中，不能正常校对而错误地与不互补的碱基配对。
missense codon：错义密码子，三联密码子改变，其导致编码表达的氨基酸残基取代原有的密码子表达的不同氨基酸。
missense mutation：错义突变，核苷酸序列中的一种改变，使编码一种氨基酸的密码子转变成另一种氨基酸的密码子。
mitogen（**adj.**，**-genic**）：基因的，遗传因子的。
mitosis：有丝分裂，细胞分裂，（1）由早期、中期、后期、末期四阶段组成；（2）使单个细胞的染色体成分完全均等的分配到子代细胞中的精确过程。
mitotic recombination：有丝分裂（染色体）重组，分裂重组，体细胞重组，在体细胞

分裂增殖的 G_2 期，而不是有丝分裂期，发生的同源染色体交换的过程。

monoclonal：单克隆的，由同一祖细胞直接发展形成的细胞群或系。

monoclonal antibody：单克隆抗体。

monocyte：单核细胞，具有吞噬作用的白细胞，其轻易经血液循环迁移到组织然后转变成巨噬细胞。

monolayer：单（分子）层，单（细胞）层，细胞培养形成的单层厚度。

monomer：单体，构成高分子质量的复合体的基本单元或亚基，它们相同或相似的结构形成共价键连接。

monotherapy：单一疗法，在疾病过程中仅仅使用单一药物进行治疗的方法。

monozygotic：同卵双生的，由同一个受精卵发育形成的双胞胎。

morphogen：形态发生素，一种能诱导构建组织形态结构的物质。

morphogenesis：形态发生，在胚胎发育过程中，各种组织细胞的构建过程。

morphology：形态学，形成细胞、组织或有机体的过程。

mortal：致命的，导致细胞群或系生长受限，甚至死亡。

mortality：死亡率，在特定疾病条件下死亡的频率。

motility：迁移力，运动的趋势，专指个体细胞从一处迁移到另一处的能力。

motogenic：促活力的，刺激细胞运动或提高细胞迁移力的信号或因素。

mucosa：黏膜，能分泌黏液起到保护分泌细胞的上皮细胞层。

multiparous：经产的，专指妇女经过多次生产的。

multipotent：多能的，指干细胞向多种细胞分化但不能发育成完整胚胎的能力。

mural：浆膜，血管壁的外层细胞；由平滑肌细胞以及周围的管腔样内皮细胞构成。

murine：鼠类的，啮齿类动物，如小鼠和田鼠等。

mutagen（**adj.**，**-genic**）：诱变剂，能引起基因突变的试剂。

mutation：突变，物种基因型的改变，包括 DNA 片段核苷酸序列的改变，染色体片段的排列，或片段拷贝数或染色体物理结构的改变等。

myelocytomatosis：髓细胞瘤病，禽类髓细胞的恶性肿瘤。

myelodysplastic syndrome：骨髓增生异常综合征，骨髓中髓细胞的过度增殖，可发展成急性髓性白血病。

myelogenous：骨髓内产生的，起源于骨髓的。见“myeloid”。

myeloid：骨髓样的，骨髓的，(1) 特指能产生粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞等造血细胞系；(2) 隶属或相似的骨髓：被认为骨髓来源的相似物。

myeloma：骨髓瘤，骨髓中 B 细胞的克隆性增生，通常见于多发性骨髓瘤（MM），能进一步产生全身骨骼系统的多发性溶骨性病变。

myeloproliferative：骨髓组织增殖的，造血系统中髓系分支来源的一些过度增殖，导致水平含量增高。

myoblasts：肌原细胞，能分化形成肌细胞的前体细胞。

myocytes：肌细胞，肌纤维，组成功能肌的细胞。

myofibroblast：成肌纤维细胞，成肌纤维细胞。

natal：分娩的，专指女性生产（生孩子）。

natural product：自然产物，通过生物，如细菌、真菌、植物等通过正常的新陈代谢而产生的化学物质。

necrosis：坏死，不同于凋亡的一种能引起细胞及其内容物的降解的死亡方式。

neoangiogenesis：血管生成，见“angiogenesis”。

neoplasia（adj.，-plastic）：瘤形成，（1）肿瘤生长的过程与状态；（2）含有形态和增殖异常的良恶性肿瘤。

neoplasm：肿瘤，见“neoplasia”。

neovasculature：新血管系统，新生的血管系统。

neural crest：神经管嵴，早期胚胎中的结构区，含有能发育成各种细胞和组织类型的前体细胞，如能形成周围神经、脸部骨骼、黑色素细胞以及各种神经分泌型细胞等。

neuroblastoma：成神经细胞瘤，起源于周围神经系统和肾上腺髓质的原发神经前体细胞形成的肿瘤。

neuroectodermal：神经外胚层的，来源于外胚层，能发育为神经系统的区域。

neurofibroma：神经纤维瘤，由神经轴索外围细胞（施旺细胞）形成的良性肿瘤。

neurofibrosarcoma：神经纤维肉瘤，由神经轴索外围细胞（施旺细胞）形成的恶性肿瘤。

neuropeptides：神经肽，由中枢神经系统或神经内分泌细胞分泌释放的寡肽。作用于神经系统的内外的其他细胞。

neurosecretory：神经分泌的，能分泌激素等物质，作用于神经信号的一类细胞。

neutral mutation：中性突变，DNA 基因序列的改变并未影响表现型，即这些突变对蛋白结构的表达并没有影响。

neutralization：中和，失效，生物活性的失效。如抗体分子对病毒感染的失活。

neutropenia：中性粒细胞减少症，骨髓和外周血中粒细胞减少或缺失。

neutrophil：嗜中性粒细胞，在外周血中含量丰富的粒细胞，表达 Fc 受体，并识别和吞噬各种细菌感染的物质。

niche（stem cell）：龛，微环境（干细胞），能促进干细胞的增殖而抑制其分化的小环境。

nondisjunction：（对偶染色体）不分离，不分开（染色体），（1）在有丝分裂过程中染色单体分离的失败或减数分裂时同源染色体分离失败；（2）对染色体分离失败的描述。

nonhomologous end joining：非同源的末端连接，DNA 修复的类型，其使两条双链 DNA 末端融合，通常见于姐妹染色单体或同源染色体末端的非定向连接。

noninvasive：无创的，诊断或治疗不需要外科手术或有创器械诊断的方法。

nonsense codon：无义密码子，遗传密码子的改变使氨基酸链（肽链）的延长终止。

nonsense mutation：无义突变，突变造成的不成熟肽链表达的终止，即编码氨基酸三联体密码转变成终止密码子。

non-small-cell lung carcinoma：非小细胞性肺癌，排除小细胞肺癌外的任意一种类型。

normoxia：含氧量正常，常氧，在特定组织环境中，细胞所需的正常的氧含量水平。

Northern blot：RNA 印迹技术，参照 Southern 杂交的方法，将电泳凝胶上的 RNA 转移到膜上，然后用放射标记 DNA 探针标记孵育。

nucleophilic：亲核的，能识别并结合弱电子物质的分子。

nucleosome：核小体，八聚物的蛋白复合体，由 H2A、H2B、H3、H4 组蛋白构成，加之以 DNA 缠绕形成染色质。

nucleotide-excision repair：核苷酸切除修复，DNA 修复的一种类型，初始涉及相关 DNA 核苷酸碱基的切除和再合成来纠正不同的 DNA 突变的过程。

null allele：无效等位基因，等位基因的移除不影响基因的正常功能，该移除的基因为无效等位基因。

nulliparous：未经产的，没有生过孩子的妇女。

occult：隐蔽的，隐藏的，不显露的。

off-target effect：脱靶效应，药物没有出现预计对靶分子的作用，如靶向分子没有对靶蛋白起作用。

oligomer：寡聚物，多于两个以上亚基的聚合物，但区别多聚合物。

oligopeptide：寡肽，由一些氨基酸残基组成的短的肽链。

oligopotent：专能性的，一些细胞具有分化种类单一或很少的能力。

-oma：良恶性肿瘤的英文后缀。

oncofetal：癌胚的，在胚胎发育过程和一些肿瘤中表达一些相关抗原。

oncogene（adj.，-genic）：瘤基因，（1）诱导癌变的基因；（2）可以转化细胞的这类基因。

oncologist：肿瘤学专家，治疗肿瘤的内科大夫，通常用药而不是手术。

oncoprotein：癌蛋白，癌基因表达的特异性蛋白。

operable：可行手术的，能够用外科手术成功治疗的行为。

ordinate cartesian：纵坐标，图的纵坐标或 y 轴。

ortholog：正源性，一种物种的基因与其他物种的基因相当接近。在物种形成事件（speciation event）之后歧化（diverge）的一对基因，它们分别存在于两个具有共同祖先的物种中，彼此互为正源基因。

orthotopic：常位的，正位的，一种解剖位置或自然状态。见“ectopic”。

osteoblast：成骨细胞，涉及纤维细胞等间充质细胞通过胶原基质与磷灰石晶体的矿物盐成骨。此类细胞称为成骨细胞。

osteoblastic：成骨细胞的，骨的损害后引起在原位新骨组织的增加。见“osteolytic”。

osteoclast：破骨细胞，一种巨噬细胞类型，对已成骨的降解和去除矿物质。

osteolytic：溶骨的，骨的损害后引起原位成骨组织的降解，见“osteoblastic”。

osteotropism：骨转移，恶性肿瘤细胞迁移到骨组织并引起克隆性增生。

overexpression：过表达，RNA 或蛋白高于正常水平的表达。

papilloma：乳头（状）瘤，上皮细胞的良性的腺瘤样增生，通常见于皮肤的良性病变。

papovaviruses：乳多泡病毒，病毒分类中的一种，如 SV40 等多瘤病毒属。

paracrine：旁分泌，副分泌，一个细胞所分泌释放的因子或激素通过信号通路作用邻近的细胞的过程。

paraneoplastic：癌旁的，机体局部的肿瘤对周边邻近组织的生物学影响，使肿瘤组织的附近也有瘤细胞，但没有直接镜下肿瘤的病理学改变。

parenchyma：实质，位于循环组织外围的部分组织，通常决定组织的特异性。

parity：分娩，（1）生产的过程；（2）妇女经产的次数。

parous：经产的，妇女已经过一次以上的分娩状态。

partial response：部分反应，抗肿瘤药的治疗使瘤体体积减小一半甚至更多的反应。

passaging：传代，从培养皿中的细胞吸取放入另一个培养皿中培养，由于第一个培养皿因接触抑制细胞数量过多而分装培养。

passive immunization：被动免疫，通过摄取外源免疫因子，多为外源性抗体，以供应和增强生物体内的免疫反应。

pathogenesis：病理（学）的，导致疾病的状态和过程。

pathological（n.，pathology）：病理（学）的（病理学），（1）疾病或与疾病相关的；（2）研究疾病的手段和方法，如光学显微镜的应用。

pathologist：病理学家，用显微镜来研究组织病变和疾病分型的医生。

pediatric：儿科的，有关儿童医学的研究。

penetrance：外显率，等位基因对表型影响的频率，例如，生殖细胞的等位基因将有多少影响并形成相关表现性。

peptidase：肽酶 a，裂解多肽的酶。

perforin：穿孔素，由细胞毒性 T 细胞产生的蛋白，能插入靶细胞的胞膜，并产生孔道，表达前凋亡蛋白而引起细胞死亡。

pericytes：周皮细胞，外膜细胞（毛细血管），血管周围紧贴着平滑肌细胞的一类细胞，如内皮细胞形成的血管腔能增强抗张力和收缩力。

peritoneal：腹膜，围脏的，腹膜是封闭的膜结构，包绕低位的胃肠道及相关如肝胰等毗邻器官表面。

permissive：允许的，感受态的，（1）热敏病毒对温度的依赖性；（2）病毒增殖所需适应性宿主细胞的状态。

peroxisome：过氧化物酶体，细胞结构中的细胞器之一，具有大量的氧化物质，如脂质等。

phagocyte：吞噬细胞，参与免疫系统的细胞，如巨噬细胞、树突状细胞——特异性吞噬，破坏其他细胞，形成细胞碎片等。

phagocytosis：吞噬（作用）。

pharmacodynamics：药效动力学，药效学，药物作用于组织细胞的时间反应过程的研究。

pharmacokinetics：药物（代谢）动力学，药运学，药动学，通过血清来描述药物在体内浓度变化的研究。

pharmacologic：药理学的，通常指小分子化合物一类的药物运用。

phenocopy：拟表型，表型模拟，由一种基因或相关调节机制引起的表型与不同基因或其他调节机制所表达的产物极其相似。

phenotype：表现型，表型，（1）可测量或观察的有机体的性状；（2）有机体所有性状的总称。

pheochromocytoma：嗜铬细胞瘤，起源于肾上腺的神经外胚层细胞的肿瘤。

phosphatase：磷酸酶，磷酸酯酶，一类从磷酸化的底物转移磷酸根基团的酶，如蛋白质中含磷酸根的氨基酸残基或磷脂的磷脂酰肌醇。

phosphoprotein：磷蛋白，含有一个或多个的磷酸根基团共价性结合的蛋白。

phosphorylation：磷酸化，通常见于蛋白质中，磷酸根基团共价结合形成亚基的状态。

physiology：生理学，（1）细胞、组织、器官、有机体的生物学功能。（2）对上述的研究内容。

pimonidazole：哌莫硝唑（抗寄生虫药），硝基咪唑的氢氯酸盐衍生药，被用来检测组织缺氧的区域。

plasma cell：浆细胞，存在于血浆中的B细胞激活后含有抗体表达的细胞。

plasma membrane：质膜，细胞膜，真核生物细胞脂质双分子层，用来隔离胞外的水相环境。

plasminogen：纤溶酶原，通过蛋白水解酶的参与，使未激活的酶原转化成激活了的纤溶蛋白酶。此类前体酶叫做纤溶酶原。

pleiotropy：（基因）多效性，在细胞或有机体中，一些特定基因或蛋白可引起下游一系列的特异性反应。

pleural：胸膜，围绕肺组织和胸壁之间的膜和腔。

pleural effusion：胸膜（腔）积液，癌细胞和积液进入胸膜和胸膜腔，形成积聚的病理状态。

pluripotent：多潜能，干细胞具有形成除了胚胎外膜的所有胚胎的组织结构的能力。

pocket protein：袋蛋白，专指有袋状结构的蛋白质，如Rb蛋白和其他袋相关蛋白。如pRb，及相关蛋白p107和p130。

podosome：足状体，足状体是一种新发现的、与细胞的迁移和运动密切相关的细胞表面特化结构。位于细胞与细胞外基质相接触的底面，呈圆盘状，圆盘的直径约为0.5μm。

point mutation：点突变，在DNA序列中的单碱基的改变。

polyclonal：多克隆的，多无性繁殖系的，来自两个或以上的祖细胞发展而来的细胞群。

polycyclic：多环的，具有复杂的密闭环状的分子结构。

polycyclic aromatic hydrocarbon：多环芳（香）烃，携带有苯环结构的复杂碳氢化合物。

polycythemia：红细胞增多症，外周血中的红细胞数量远远超过正常值的症状。

polykaryon：多核体，在细胞中同一胞质中含有多个细胞核。

polyp：息肉，腺瘤的生长方式；可见于小肠。

polypectomy：息肉切除术，外科手术切除息肉的方法。

pool：库，相似物或相同物的收集（总体），如基因库、干细胞库等。

post-mitotic：有丝分裂期后的，用来描述细胞停滞间期时相，避免再次进入生长分裂

周期。

post-translational modification：翻译后修饰，在初始聚合作用形成的蛋白多肽主链后共价地结合其他分子达到蛋白的修饰改变。

prenatal：产前的，妇女处于孕期并未生产的状态。见“natal”。

primary cell：原代细胞，原始细胞：（1）从生物组织中取得并用培养皿培养，并尚未开始繁殖；（2）从组织中取得并用培养皿培养，之后由其中的一小部分用于传代的细胞。

primary tumor：原发性肿瘤，未知来源引起的肿瘤的发生。发展，演进形成的新生物。

primase：引物（合成）酶，引发酶，在细菌 DNA 复制中合成 RNA 引物的 RNA 聚合酶。

primer：引物，结合到单链 DNA 上的寡核苷酸（DNA 或 RNA），提供链合成的起始点。

primitive：原始的，初级的，（1）细胞尚未分化时状态；（2）胚胎细胞。

probe：探针，带有放射标记的，能在退火时特异结合到互补的核苷酸序列中的小片段 DNA 或 RNA，可用来分析检测靶基因序列。

procarcinogen：前致癌物，非活性的化合物进入机体，经过新陈代谢，转化成具有高活性的致癌作用。这类前体化合物称为前致癌物。

pro-drug：潜药，可生成生物学活性的未激活的药物前体。

pro-enzyme：酶原，酶的未激活状态，需要一些条件，如蛋白水解酶等，使其活性中心暴露活化。

professional antigen-presenting cell：传递抗原的细胞，见“antigen-presenting cell”。

progenitor cell：祖细胞，具有增殖分化能力的细胞。

progeria：吉福德（氏）综合征，郝-吉二氏综合征，早老，个体在幼年阶段表现为衰落过度的综合征。

prognosis：预后，临床治疗中对疾病的未来估测与评价，通过组织病理和生物标志物等手段来分析诊断。

programmed cell death：程序性细胞死亡，见“apoptosis”。

progression：演进，见“tumor progression”。

progression-free survival：抗癌治疗观察期，抗癌治疗的早期到后来的临床复发或病灶减少甚至清除的时期。

prokaryotic：原核的，如细菌等相关生物具有相对较小，无核的细胞结构。

promoter：启动子，（1）肿瘤演进的多阶段因素；（2）基因上游的核苷酸序列，被 RNA 聚合酶结合后起始转录。

promotion：促进，刺激或加剧肿瘤的演进过程，通常认为与基因组破坏没有直接关系。

proofreading：校正读码，某些 DNA 聚合酶具有 $3'\rightarrow5'$外切核酸酶活性，可纠正错配的核苷酸。

prophase：前期，有丝分裂的第一阶段，期间染色质开始浓缩，中心体开始装配。

prophylactic：预防（性）的，预防剂。

protease：朊酶，蛋白酶，能清除或水解蛋白亚基的酶。

proteoglycan：蛋白多糖，黏蛋白，一个或多个氨基葡聚糖链共价结合到蛋白核心区而形成的分子。

proteolysis（adj.，-lytic）：蛋白质水解，通过蛋白酶的参与，切割肽链，形成分子质量较小的片段甚至单个氨基酸的过程。

proteomics：蛋白组学，活细胞合成的功能性蛋白的集合。

proto-oncogene：原癌基因，存在于正常细胞中，可受到 DNA 破坏因子或病毒基因组整合。表现为癌基因的功能表达。

provirus：前病毒，反转录病毒的基因组通过反转录获得双链 DNA 拷贝，它作为外源型质粒（非染色质来源）能短暂存在；或当整合到感受态细胞的染色体的 DNA 当中能稳定遗传。

pseudopregnant：假妊娠的，假孕的，由于一定激素水平的暴露，使得妇女在生理上表现为极其相似的妊娠症状。

pulmonary：肺的。

pyknosis（also spelled pycnosis）：固缩，致密化（见-固缩现象，核固缩），胞核塌陷后形成致密深染的结构。

quartile：四等分或统计的四分位法。

rad：拉德（辐射剂量单位），等于 0.01Gy 或吸收了 0.01J 的辐射量。

radioautography：放射自显影，见“autoradiography”。

radiosensitive：对放射线敏感的，用来描述组织或细胞对放射的敏感，引起死亡，如放疗。

radiotherapy：放射疗法，放射治疗，通过 X 射线照射，治疗肿瘤等相关疾病。

rate-limiting：限制速率，在多阶段的过程中的某一阶段对整体反应速率的关键影响，缘于所有阶段中其动力学速率是最慢的。

reading frame：读码框，（1）DNA 序列中用来表达蛋白的三联体密码子的序列；（2）序列中的三联体密码子特异翻译成相关蛋白的氨基酸序列。

receptor：受体，存在于胞内或胞膜上的能特异性结合相关信号分子（配位体），引起一系列受体的级联反应，诸如细胞增殖调控这方面等。

recessive：隐性的，同一基因座上的等位基因如果是杂合子，各基因又有不同的性状表达，当显性基因表达相关特征时，隐性基因则不表达其自身性状。

reciprocal translocation：相互易位，不同染色体片段之间的相互交换，形成的易位平衡或不稳定性。

reductionism：简化法，一种科学研究方法，用个体研究来简化对这一系统所有组分的研究。

refractory：耐受的，对治疗试剂和信号通路不能应答的状态。

rejection：（免疫）排斥现象，机体启动的免疫防御系统，对外源性移植细胞或组织的杀伤作用，见于同种异体移植等。

relapse：复发，（1）如肿瘤等疾病在早期看似成功的治疗，其后症状的再次出现；（2）症

状复发的持续。

remission：缓和，减轻，疾病状态的消失或治愈，也可能伴有潜在的复发与恶化。

renal：肾脏的。

replicative immortality：复制的不死性，见“immortality”。

repressed：被抑制的，由于某种原因，基因没有转录和表达产物。

repression：阻遏，阻遏过程，诱导基因下调或不表达的调控机制。

resection：切除（术），外科手术切除的过程。

restriction fragment length polymorphism：限制性片段长度多态性，由于在DNA一端或两端存在限制性位点多态性使得限制性片段的长度具有可变性。

restriction point：限制点，在细胞周期的G_1期末，决定细胞进程的时间点；可表现为继续进入分裂期，停滞在G_1期或退出分裂期，进入G_0期。

retinoblastoma：视网膜母细胞瘤，起源于视网膜专能干细胞的病变引起的肿瘤。

retrovirus：反转录病毒，通过反转录酶把自身的RNA基因组信息，插入到宿主的DNA中的一类病毒。

reverse transcriptase：反转录酶，病毒用此酶能将RNA为模板，形成互补的DNA拷贝（cDNA）。

reverse transcription：反转录，反转录酶参与，将RNA为模板合成cDNA的过程。

ribosomes：核糖体，胞内合成蛋白的细胞器。

Rituxan：B细胞单克隆抗体，抗CD20的单克隆抗体设计含有小鼠抗原结合区（可变区）和人的不变区。见“rituximab”。

sarcoma：肉瘤，由间叶组织（包括纤维结缔组织、脂肪、肌肉、血管、骨、软骨组织等）发生的恶性肿瘤的统称。

schwannoma：神经鞘瘤，起源于神经轴索外围的神经鞘细胞（施旺细胞）而发生的肿瘤。

second messenger：第二信使，作用于胞内激素受体，传递胞内信号的小分子物质。

section：组织切片。

segregation：分离，（1）见于有丝分裂过程中染色体的分离，形成并进入两个子代细胞中的过程。（2）减数分裂中等位基因的分离。

selectivity：选择性，靶向性治疗可以特异识别靶细胞或组织，而对正常细胞副作用小或没有的一类治疗特性。

self-reactive：自身免疫激活反应，机体对自身正常组织或细胞的相关抗原产生特定免疫复合体（抗原抗体复合物）。

seminoma：精原细胞瘤，起源于睾丸生殖细胞的肿瘤。

senescence：衰老或称“老化”，原来能增殖的细胞不能增殖。

sequence motif：基序，（1）与生物功能相关的短的寡核苷酸序列。（2）功能蛋白的特异性氨基酸序列。

serial passaging：连续传代，将培养皿中的细胞部分移出稀释，不断进行多个培养皿的连续培养，可以观察细胞的寿命和传代能力。

serpentine：与 G 蛋白偶联的受体家族，头尾连接折叠的 7 次跨膜形成的蛋白。

serum（pl.，sera）：血清，血液凝固后留下的上清液。

sinusoid：窦状隙，窦状的，存在肝脏组织中定位于肝细胞附近的毛细管样区域，伴有内皮细胞而缺乏壁细胞和基底细胞膜成分。

small-cell lung carcinoma：小细胞肺癌，该癌细胞具有神经分泌的功能，形成副肿瘤综合征。

soma：体细胞，除了生殖细胞（精子、卵子、相关生殖祖细胞等谱系）以外的所有细胞。

somatic mutation：体细胞突变，除了生殖细胞外的其他细胞基因组遭受打击突变，不影响或传递给子代。

Southern blot：DNA 印迹法，DNA 在电泳前用限制性内切核酸酶消化，经琼脂糖电泳将片段化的 DNA 转移到滤膜上，然后带有放射标记的核苷酸探针与滤膜杂交，最后通过放射自显影来观察片段大小与种类的方法。

splicing：剪接，（1）已知 RNA 的前体转录过程中将定义片段缺失，使两段 RNA 融合在缺失片段的侧翼区。（2）从不连续基因的初级转录物中去除内含子而保留外显子的过程。

sporadic：散发的，在大样本的群体中疾病发生是随机的，没有明显的遗传素质，即遵照基因易感性遗传给子代。

squamous：鳞状的，构成皮肤或管腔（食道、阴道等）的上皮细胞失去分泌功能。

stem cell：干细胞，在生物体的整个生命周期中连续分裂的前体细胞。它既可以自我更新，又有分化的潜能。

stereochemistry：立体化学，分子三维结构的描述，如蛋白质，可以观察其化学行为的结构和分子相关生化功能。

stochastic：随机的，并不是事先决定或已知明确了的，而是随机发生的事件。

stoichiometric：化学计量的，两种以上的分子物质在特殊环境中存在的相对摩尔浓度。

stratify：分层，分类，对同一相似类型，如肿瘤等，进行特殊分类或亚型分型。

stressor：应激原，引起生理反应的因素或因子。

stroma（pl.，stromata）：基质，组成上皮，造血，肿瘤等组织的间质组分，包括纤维细胞、脂肪细胞、内皮细胞和各种免疫细胞以及相关的细胞外成分。

stromalization：基质化，正常或肿瘤组织产生基质的过程。

subcutaneous：皮下的，皮肤以下的，多指真皮层以下的部位。

submicroscopic：亚显微的，用光学显微镜观察仍很小的状态。

substrate：底物，作用在酶上的分子。

supernumerary：多余的，多于或高于正常的。

surrogate marker：内标，内参，可用来量化的参数，来显示对另一生化作用的平行反应。

synapse：突触，在相互作用的免疫细胞或细胞毒性 T 细胞与靶细胞之间的形成的物理连接，易于信号交换，如细胞毒 T 细胞可将细胞毒性颗粒作用与靶细胞上。

synchronous：同步，（1）在同一时间或瞬时互动；（2）使一些细胞在相同时刻进入细

胞周期的某一特殊阶段。

syncytium：合胞体，通过细胞融合技术，将多个细胞融合形成共有的胞膜和胞浆。

syndrome：综合征，鉴定某一特殊疾病的所有症状和体征。

syngeneic：同系基因型（的），（1）不同生物体含有相同的基因遗传背景，如纯系小鼠的成员。（2）用来描述细胞或组织来源于相同的遗传背景，如细胞系或生物个体。

T-loop：T 环，DNA 末端套索样结构，包含附着在双链区的带外挂或凸出 3′端的插入。

tamoxifen：三苯氧胺，模拟雌激素合成的药物，能特异性结合雌激素的受体。

telomerase：端粒酶，能特异性延伸 DNA 的端粒的酶，其含有 RNA 和相关反转录酶等物质，来稳定染色体末端。

telomere：端粒，真核染色体的末端，能保护染色体，防止降解或与其他染色体融合。

telophase：末期（细胞分裂），有丝分裂的第四阶段，染色质去浓缩，核膜重新出现。

temperate：适中的，感染因子，如病毒等能对宿主细胞或机体造成最小的破坏。见“virulent”。

temperature-sensitive：温度敏感的，热敏，细胞或病毒生长所需的特定温度这种状态。

teratogen：致畸原，扰乱胚胎形态发生的畸变因素。

teratoma：畸胎瘤，胚胎干细胞发展形成的肿瘤，可分化成牙齿、毛发、骨等多种组织成分。

tetraploid：四倍体的，染色体具有明确的四个单倍体或两个双倍体组分。

therapeutic index：治疗指数，针对病变组织的治疗程度，如在肿瘤治疗中，比较对正常组织的影响；两种相互作用的比率。如药物对癌组织和正常组织作用的比较。

therapeutic window：治疗窗带，大于最小治疗剂量而低于最大耐受剂量的药物浓度范围。

thrombin：凝血酶，来自血浆的蛋白酶，常发生在创伤由血小板启动激发血液凝固或把纤维蛋白原转变成纤维蛋白的一类酶。

thromboembolus：血栓栓塞，血栓栓子，见“embolus”。

thrombopoiesis：血小板生成，引起血小板生成的过程。

thrombopoietin：血小板生成素，诱导刺激巨核细胞产生血小板的相关因子。

thrombus（pl-，thrombi）：血栓，血液凝固或血液中某些有形成分凝集成固体质块。

tissue culture：组织培养，用培养皿培养瓶进行体外组织细胞的培养过程。

tissue factor：凝血酶原激酶，体内多种细胞在其细胞表面表达的糖蛋白，与凝血因子相互作用启动凝固状态。

tissue-specific gene：组织特异（性）的基因，能表达组织特异性的基因。

tolerance：耐受性，针对由正常组织细胞表达的特定抗原，免疫系统缺乏反应识别能力。

tomography：X 射线断层术，计算机成像技术的一种。通过 X 射线，超声及其他影像手段，获得如人体在一定深度的组织横断面的整合图像的方法。

topoinhibition：接触抑制，见“contact inhibition”。

totipotent：全能的，描述干细胞具有分化成各胚层细胞的能力以及可以发育成完整胚

胎的潜能。

toxicity：毒性，药物对正常组织细胞代谢的副作用。

transcription：转录，合成基因的 RNA 拷贝的全过程。

transcription factor：转录因子，调节基因转录的蛋白，通常作用在启动子区域。

transdifferentiation：转分化，转分化是一种类型的细胞或组织在某些理化因素作用下转变为另一种正常细胞或组织的现象。这种细胞表型转化对机体具有修复损伤或加重病变的双重生物学意义。

transduction：转导，诸如蛋白的信号元件，接收一种信号然后释放另一种信号的应答过程；细菌或细胞的基因通过包装到病毒等载体，从一个细胞转移到另一个细胞。

transfection：转染，将纯化的 DNA 分子导入哺乳动物细胞中。通常用磷酸钙沉淀法。

transferase：转移酶，转移因子，附着在分子复合体的酶。如谷胱苷肽和它的作用底物。

transformant：转化株，转化细胞。

transformation：转化，（1）把正常细胞转化成具有癌变潜质的细胞；（2）通过遗传成分来筛选相关细胞。

transgene：转基因，（1）利用基因克隆的方法转入动物生殖细胞中；（2）对生殖细胞基因的特殊改造。

transgenic：转基因的，（1）往往通过基因克隆方法对动物或饲养动物生殖基因的改造；（2）通过一系列的遗传操作方法，往往用同源重组等对动物的生殖细胞基因进行改造。

transit-amplifying cell：细胞自我更新能力，来源于干细胞分裂后形成的未分化细胞，在其未形成高分化细胞前，经过有限的指数级复制更新，往往见于多种组织的分裂期后。

transition：转换，嘌呤与嘌呤，嘧啶与嘧啶之间替换形成的点突变。

translation：翻译，多肽或蛋白的合成过程，其氨基酸序列由 mRNA 中的核苷酸序列通过遗传密码子决定。

translocation：易位（结构染色体畸变），（1）用显微镜观察到染色体核型改变，往往见于一个染色体片段不正常地融合到别的染色体上导致的染色体重排；（2）细胞的实体部分移入另一细胞中；（3）转位，翻译过程中核糖体沿 mRNA 的移动。

transmembrane：跨膜，存在于疏水环境的脂质双分子层，蛋白穿梭入膜、出膜形成的区域结构。

transphosphorylation：转磷酸（作用），一个蛋白质对另一个蛋白质的磷酸化过程。如激酶亚基对相关受体的磷酸化。

transposon：转座子，可在 DNA 中的一个位置移动到另一个位置的遗传元件。

transversion：颠换，DNA 分子中导致嘌呤和嘧啶之间相互取代的点突变。

triploid：三倍的，三倍体，具有完整的三个单倍体核型组成。

tritium：三重氢，氚，氢的放射性同位素^{3}H。

-trophic：有关营养的，用来维持生存的。

-tropic：向性的，细胞或机体的运动趋势或者直接朝向或作用相关的事件。

tropism：向性，趋向性，（1）细胞对特异区域和信号的运动趋势；（2）例如，在转移

癌当中，癌细胞迁移具有特定方向，可在特异的组织中发现转移或复发的肿瘤。

tumor progression：肿瘤演进，（1）由正常细胞到肿瘤细胞转变的多阶段过程；（2）良性肿瘤向恶性肿瘤的转变；（3）从依赖促进因子的恶变前细胞到完全独立的恶性细胞的转变过程。

tumor rejection：肿瘤排斥，机体对肿瘤形成的抑制过程，通过移植细胞输入增加肿瘤的免疫原性，获得抗肿瘤的能力。

tumor suppressor gene：肿瘤抑制基因，抑癌基因。

tumoricidal：破坏癌细胞的，能够杀死和（或）破坏肿瘤组织的。

tumorigenic：致瘤的，发生肿瘤的，（1）瘤细胞注射适当的动物宿主能产生肿瘤的能力；（2）特殊的致瘤病毒通过整合，启动癌变的能力。

ubiquitylation：泛素化，泛素化是单个或多个泛素在泛素激活酶、泛素结合酶及泛素蛋白质连接酶的作用下共价修饰底物蛋白质的过程，不仅可导致蛋白质的降解，还可直接影响蛋白质的活性和细胞内定位，是调节细胞内蛋白质功能和水平。

ultimate carcinogen：终致癌剂，最终致癌物，其含有带正电的亲电子物质，能直接致癌，源于它能与DNA、RNA、蛋白质等生物大分子共价结合而导致的结构破坏，引起细胞癌变。

urothelium：膀胱上皮，膀胱组织的特异形上皮组织——移形上皮。

vacuole：空泡，通常见于在一定的生理应激或特定病毒感染时存在于胞浆中的小泡状内含液体的结构。

vascularized：血管化，如肿瘤组织中新血管的生成。

vasculature：血管系统，心脏与血管构成的网络系统。

vasoactive：血管作用的，作用于血管的，对血管功能的调节，如通透性和收缩性等。

vector：载体，（1）通常用病毒，将携带目的基因从一个细胞转到另一个细胞；（2）感染的有机体能通过一定途径将感染因子传递给其他有机体。

vehicle：载体，媒介，用来适当传递和释放药物的物质。

venule：小静脉，连接毛细管和大静脉的血管腔。

villus：绒毛，见于小肠内向肠腔凸出的上皮组织细胞来源的指样结构。

vimentin：（中间丝）波形蛋白，一种构成诸如纤维细胞等间质细胞骨架的中间纤维。

viremia：病毒血症，在机体血流中病毒含量高的体征。

virion：病毒体，病毒粒子，病毒颗粒包括衣壳和病毒基因组。

virulent：剧毒的，致命的，一种感染因子，诸如一类能感染宿主细胞或机体的病毒，能破坏细胞组织结构，造成细胞死亡。见“temperate”。

virus stock：病毒库，溶有病毒颗粒被用来感染细胞或生物体的装置。

vital dye：活体染料，能染活体的组织细胞并能长时间维持在所需的组织中，而不危害其生存力。

vitiligo：白斑病，皮肤的缺陷，多由于自身免疫导致表皮中黑色素细胞分泌颗粒的缺失而使皮肤缺乏色素。

wild type：野生型，在同一物种的大多数个体而言，等位基因的表达状态。

xenobiotic：异物的，外来的，正常代谢所没有的或来自机体外的具有生物活性的复合物。

xenograft：异种移植物，用来移植到不同物种体内的其他物种的正常组织或肿瘤组织。

xenotropic：嗜异性的，一类反转录病毒，能在不同物种间感染和复制。

ZIP code：邮编，ZIP 密码，美国邮政系统由 5 位数来表示不同地区。通过类比，假设等方法来观察散布瘤细胞在特异组织中血管腔面的分布。

zymogen：酶原，活性酶在未激活时的前体结构。

zymogram：酶谱，在凝胶电泳上各类蛋白迁移率的分析技术，来确定它们在电泳中的活性度和定位。

索　　引

（按汉语拼音顺序）

[General Information]
书名=癌生物学
页数=801
SS号=12268803